

Bedeutung von IRAG für die Calciumregulation im glatten Muskel



Dissertation

**Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Universität Regensburg**

vorgelegt von
Bernhard Hieke
aus Aichach
im Jahr 2011

Dissertation eingereicht:

Juli 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. Sigurd Elz

1. Gutachter (1. Prüfer):

Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

2. Gutachter (2. Prüfer):

Herr Prof. Dr. Frank Schweda

3. Prüfer:

Herr Prof. Dr. Achim Göpferich

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	4
Abkürzungen.....	4
1. Einleitung	7
1.1 Tonusregulation der glatten Muskulatur	7
1.2 Calciumsignalwege im glatten Muskel.....	8
1.2.1 Calciumkanäle und ihre Funktionen	9
1.2.1.1 Calciumkanäle des SR	9
1.2.1.2 Plasmamembrankanäle.....	10
1.2.2 Calciumtransporter	13
1.3 Der NO/cGMP/cGK Signalweg.....	14
1.3.1 Die cG-Kinasen	16
1.3.1.1 Substrate der cGK1	17
1.4 Ziele dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien und Kits	23
2.1.4. Antikörper und Farbstoffe.....	24
2.2 Versuchstiere.....	25
2.3 Isolierung muriner Gewebe	26
2.3.1 Gewebeaufschluss.....	26
2.3.2 Gewinnung und Kultivierung primärer glatter Muskelzellen	27
2.4 Immunfluoreszenz.....	28
2.4.1 Mitochondrienfärbung	29
2.5 Proteinanalyse	29
2.5.1 Proteinbestimmung nach Lowry	29
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.5.3 Western Blot	31
2.5.4 Detektion.....	31
2.5.4.1 Zwischenfärbung	32
2.5.4.2 Photochemische Detektion	32
2.6 Mikroskopie.....	32

2.6.1 Konfokal Mikroskopie	32
2.6.2 Epifluoreszenz Mikroskopie.....	33
2.6.2.1 Messstand für immunologische Detektion	33
2.6.2.2 T.I.L.L System	34
2.7 Calciummessungen	34
2.7.1 Zellkultur für Ca^{2+} -Messungen.....	35
2.7.2 Messung	35
2.8 Membranpotentialmessungen	36
2.8.1 Vorbereitungen	36
2.8.2 Messung	37
2.9 Statistik	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Expression von Proteinen	38
3.1.2 Expression der IP_3 -Rezeptoren	38
3.1.3 Expression der cG-Kinasen.....	39
3.2 Immunfluoreszenz.....	40
3.2.1 Überprüfung der Deletion von IRAG.....	41
3.2.2 Kolokalisation von IRAG mit cGK1 und $\text{IP}_3\text{R1}$	42
3.2.3 Lokalisationsstudien in KO und WT	46
3.2.3.1 $\text{IP}_3\text{R1}$	47
3.2.3.2 cG-Kinasen	48
3.2.4 Untersuchung einer möglichen Kerntranslokation der cG-Kinasen	52
3.2.4.1 Überprüfung einer proteolytische Spaltung von cGK1 α	53
3.2.5 Überprüfung der Kinase Aktivität.....	54
3.3 Calcium Messungen	58
3.3.1 Effekt von IRAG auf Hormon induzierte Calcium Signale	58
3.3.1.1 Effekt von 8 Br-cGMP	59
3.3.1.2 Effekt von Atriale Natriuretischem Peptid.....	61
3.3.1.3 Effekt von DEA-NO	62
3.3.2 Effekt von IRAG auf spannungsabhängigen Calciueinstrom.....	64
3.3.3 Effekt von IRAG auf kapazitativen Calcium Einstrom	66
3.3.3.1 Einfluss von Natriumionen	70
3.3.3.2 SOC Kanäle	73
3.3.3.3 Calcium abhängige Kaliumkanäle	75
3.3.3.4 Calcium abhängige Chloridkanäle	77
3.4 Membranpotentialmessungen	80
4. Diskussion	82

4.1 Expression von Proteinen des trimeren Komplexes	82
4.2 Lokalisation von Proteinen des trimeren Komplex.....	83
4.3 Calciumregulation in VSMC durch IRAG	86
4.3.1 Hormonvermittelte Calciumfreisetzung	86
4.3.2 Spannungsabhängiger Calciumeinstrom	88
4.3.3 SOCE.....	89
5. Zusammenfassung	96
7. Literaturverzeichnis.....	98
7.1 Zitierte Veröffentlichungen	98
7.2 Eigene Veröffentlichungen	107
7.2.1 Abstracts	107
7.2.2 Originalarbeiten.....	107
8 Anhang	109
8.1 Danksagung.....	109
8.2 Eidesstattliche Erklärung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung und Wirkung von cGMP	16
Abbildung 2: Substrate und Effektoren der cGK1 Signalkaskade im glatten Muskel	18
Abbildung 3: Darstellung des trimeren Komplexes.....	20
Abbildung 4: Expression von IRAG.....	38
Abbildung 5: Expressionsvergleich der IP ₃ R Subtypen	39
Abbildung 6: Expression der cG-Kinasen.....	40
Abbildung 7: Reinheit der Primärkultur.....	41
Abbildung 8: Abwesenheit von IRAG in den VSMC	42
Abbildung 9: Kolokalisation von IP ₃ R1 mit IRAG	43
Abbildung 10: Kolokalisation von cGK1c mit IRAG	44
Abbildung 11: Kolokalisation von cGK1β mit IRAG	45
Abbildung 12: Kolokalisation von cGK1α mit IRAG	46
Abbildung 13: Lokalisation von IP ₃ R1 in WT und KO	48
Abbildung 14: Lokalisation von cGK1α in den Zisternen des Golgi Apparates	49
Abbildung 15: Kolokalisation von cGK1β mit SERCA 2.....	50
Abbildung 16: Kolokalisation von cGK1β mit Golgin97.....	51
Abbildung 17: Kolokalisation von cGK1β mit MitoTracker	52
Abbildung 18: Behandlung von VSMC mit 250 μM 8-pCPT-cGMP	53
Abbildung 19: Korrelation von N-terminalem Bereich und der 'common' Domäne der cGK1α	54

Abbildung 20: Phosphorylierung von IP₃R155

Abbildung 21: Phosphorylierung von Phospholamban56

Abbildung 22: Phosphorylierung von VASP57

Abbildung 23: WT VSMC mit Fura 2 beladen.....58

Abbildung 24: Effekt von 8 Br-cGMP auf Hormon vermittelte Calciumtransienten.....60

Abbildung 25: Effekt von ANP auf Hormon vermittelte Calciumtransienten62

Abbildung 26: Effekt von DEA-NO auf Hormon vermittelte Calciumtransienten63

Abbildung 27: Einfluss von IRAG auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom65

Abbildung 28: Effekt von IRAG auf 8 Br-cGMP vermittelte SOCE und VOCE Inhibierung67

Abbildung 29: Effekt von IRAG auf 8 Br-cGMP vermittelte SOCE Inhibierung69

Abbildung 30: Effekt von Natrium auf SOCE.....71

Abbildung 31: Effekt von Natrium auf SOCE inklusive VOCE73

Abbildung 32: Effekt von 2 APB auf SOCE74

Abbildung 33: Effekt von Charybdotoxin auf SOCE76

Abbildung 34: Effekt von Flufenaminsäure auf SOCE.....78

Abbildung 35: Effekt von Flufenaminsäure auf SOCE inklusive VOCE80

Abbildung 36: Verlauf des Membranpotentials während SOCE81

Abbildung 37: Potentieller Mechanismus der SOCE und SOCE Hemmung durch cGK1β/IRAG.....95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte23

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....23

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und kits24

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper25

Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper25

Tabelle 6: Liste der verwendeten Farbstoffe25

Tabelle 7: Liste der verwendeten Filterwürfel.....33

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro10 ⁻⁶
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
8 Br	8 Bromo
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AM	Aceto-Methyl-Esther

ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-tri-phosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BA	bis-Acrylamid
BK/IK/SK	Calciumaktivierbare Kaliumkanäle
BNP	brain derived natriuretic peptide
BP	Bandpassfilter
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CaV	spannungsabhängiger Calciumkanal
cGK	cGMP abhängige Kinase, cG-Kinase
cGK α bzw. β	cGMP abhängige Kinase Typ α bzw. β
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CICR	Calcium vermittelte Calciumfreisetzung
CICa	Calciumaktivierbarer Chloridkanal
CNP	C-typ natriuretisches Peptid
CPR	Cystein rich Protein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraminsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fetales Kälberserum
FE	Fluoreszenzeinheiten
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
g	Erdbeschleunigungsäquivalent oder Gramm
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
GKAP	cG-Kinase Anker Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HXP	Metall Halogenid Brenner
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat Rezeptor
IRAG	Inositoltriphosphat Rezeptor assoziiertes cG Kinase Substrat
k	kilo 10 ³
KO	Knock Out
l	Liter
m	mili 10 ⁻³ bzw Meter
ml	mili Liter
MLC	Myosin-Leichte-Kette
MLCK	Myosin-Leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase
MT	MitoTracker
MW	Molekulargewicht
MYPT1	regulatorische Untereinheit der Myosinphosphatase
N	Newton
n	nano 10 ⁻⁹
NCX	Natrium/Calcium Austauscher
NE	Norepinephrin

NFAT	nuclaeer factor of activated T-cells
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Orai 1/2/3	Calciumkanäle der Plasmamembran
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PCR	Polymerase Ketenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PLC β	Phospholipase C β
PVDF	Poly-Vinyliden-Difluorid
RGS	regulator of G Protein
ROCE	Rezeptor vermittelter Calciumeinstrom
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
SERCA	Sarko-/endoplasmatische Retikulum ATPase
sGC bzw. pGC	lösliche bzw. partikuläre Guanylatzyklase
SM	glatter Muskel (smooth muscle)
SOCE	kapazitativer Calciumeinstrom
SPF	spezifisch pathogenfrei
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM 1/2	Stromal interacting molecule 1/2
TBST	Tris gepufferte Lösung mit Tween 20
TEMED	Tetraethylenmethylen-diamin
TG	Thapsigargin
TRITC	Tetramethyl Rhodamine
TRPC	classical transient receptor potential
U	Unit oder Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
VIS	Bereich des sichtbaren Lichts
VOCE	Spannungs abhängiger Calciumeinstrom
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
W	Watt
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die intrazelluläre Calciumkonzentration ist für eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen von zentraler Bedeutung. So fungiert Calcium als wichtiger Modulator der Vesikelsekretion und synaptischen Übertragung, ist beteiligt an der Transkription, der Proliferation und Apoptose von Zellen und ist von entscheidender Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion/aggregation und Muskelkontraktion. Über diese mannigfaltigen Mechanismen ist Calcium an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Die Steuerung der hierzu benötigten Signale ist komplex und oftmals widersprüchlich. So wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte besonders mit der Erforschung der NO/cGMP/cGK-Signalkaskade, bedeutende Erkenntnisse über diese komplexe Steuerung gewonnen. Vor allem Im Hinblick auf ihr therapeutisches Potential im Bereich der Herz- Kreislauferkrankungen steht diese Signalkaskade nach wie vor im Interesse der wissenschaftlichen Forschung.

1.1 Tonusregulation der glatten Muskulatur

Der Tonus einer glatten Muskelzelle beruht auf der Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente. Im Falle der Kontraktion kommt es zur Verkürzung der Fasern. Im Falle der Relaxation zur Längung. Die Verkürzung ist dabei ein Energie abhängiger Prozess, bei dem aufgrund des sich wiederholenden Brückenschlages der Myosinköpfe die Myosinfilamente sukzessiv an den Aktinfilamenten entlang gleiten (Khalil 2010). Entscheidend für die Aktivität des Myosinköpfchens ist der Phosphorylierungsgrad seines Regulators, der Myosin-Leichte-Kette (MLC). Im Falle der Phosphorylierung derselbigen an Serin 19, steigt die Aktin abhängige ATPase Aktivität des Myosins, es kommt zum vermehrten Brückenschlag und zur Kontraktion (Akata 2007a). Bei einer Dephosphorylierung sinkt der Tonus aufgrund passiver Rückstellkräfte. Der Tonus der Muskulatur beruht somit letztendlich auf dem Phosphorylierungsgrad der MLC. Dieser stellt das Resultat zweier gegensätzlicher Signalwege dar. Einer mündet in der Aktivierung der MLC-Kinase (MLCK), welche die Phosphorylierung und damit die Kontraktion bedingt, der Gegenspieler ist die MLC-Phosphatase (MLCP), welche durch eine Dephosphorylierung die Relaxation fördert (Lee et al. 1997). Die Aktivität der MLCK ist dabei von der intrazellulären freien Calciumkonzentration abhängig. Bei Calciumkonzentrationen ab 1 μM bindet ein Komplex aus Calcium und Calmodulin (CaM) an MLCK, wodurch diese aktiviert und MLC vermehrt phosphoryliert wird (Somlyo and Somlyo 1994; Winder et al. 1998). Bei hohen Calciumspiegeln kann die Calcium/CaM-abhängige-Kinase II aktiviert werden, die durch eine Phosphorylierung der MLCK deren Affinität für den Calcium/CaM-Komplex senkt und somit einer überschießenden

Aktivierung entgegenwirkt (Stull et al. 1997). Dagegen wird die Aktivität der MLCP Calcium unabhängig über deren Phosphorylierungsgrad gesteuert. Über diesen Mechanismus kann eine Änderung des Tonus unabhängig von einer Änderung der Calciumkonzentration bewerkstelligt werden. Die MLCP besteht aus drei Untereinheiten: einer katalytischen Domäne von 37 kDa (PP1 δ), einer regulatorischen Domäne von 130 kDa (MYPT1) und einer 20 kDa Einheit, deren Funktion bislang unbekannt ist (Hartshorne 1998). Eine Phosphorylierung der MYPT1 an Threonin 696 führt zu einer verminderten Phosphatase Aktivität der MLCP und somit zu einem gesteigerten Tonus (Wooldridge et al. 2004). Eine solche Inhibitionsphosphorylierung wird durch die Aktivierung der Rho-Kinase verursacht. Diese wiederum wird durch RhoA aktiviert. RhoA ist dabei ein monomeres G-Protein mit intrinsischer GTPase Aktivität welches durch die Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit $\alpha_{12/13}$ Untereinheit aktiviert wird (Gong et al. 1997; Gohla et al. 2000). Neben RhoA kann aber auch Arachidonsäure die Rho-Kinase aktivieren (Akata 2007b). Daneben existiert mit dem Proteinkinase C stimulierten Inhibitorprotein (CPI-17) ein weiterer Weg der Calciumsensibilisierung. Nach Phosphorylierung durch Proteinkinase C PKC oder Rho-Kinase, stellt dieses einen potenten Inhibitor der katalytischen Domäne der MLCP dar (Eto et al. 1995; Woodsome et al. 2001; Kitazawa et al. 2003) und führt somit über eine indirekte Erhöhung des MLC Phosphorylierungsgrad zu einem erhöhten Tonus.

Zudem können PKC und Rho-Kinase Calponin phosphorylieren (Kanashiro and Khalil 1998; Kaneko et al. 2000). Dieses ist ebenso wie Caldesmon an den Aktinfilamenten lokalisiert. Caldesmon wiederum kann durch die Mitogen-aktivierte-Kinase phosphoryliert werden. Beiden Proteinen gemeinsam ist die Eigenschaft im phosphorylierten Zustand keine Hemmung der ATPase Aktivität von Myosin mehr zu bedingen, was zu einem vermehrten Brückenschlag und folglich zu einem erhöhten Tonus führt (Khalil et al. 1995; Winder, Allen et al. 1998; Kim et al. 2008). Hierin besteht eine zusätzliche Möglichkeit, den Muskeltonus zu beeinflussen, unabhängig von der Calciumkonzentration und dem Phosphorylierungsgrad der MLC.

1.2 Calciumsignalwege im glatten Muskel

Der freien intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+}_i) kommt eine essentielle Bedeutung bei der Tonusregulation der glatten Muskulatur zu. Zum einen kann wie bereits erwähnt konzentrationsabhängig der Tonus der glatten Muskulatur gesteuert werden (Somlyo and Somlyo 1994; Winder, Allen et al. 1998), zum anderen kann über Calcium abhängige Prozesse das Membranpotential und damit die Erregbarkeit der Muskelzelle beeinflusst werden. Zudem kommt über die Interaktion mit Calcium abhängigen Transkriptionsfaktoren ein Einfluss auf die Gentranskription und somit auf den Phänotyp

der Zellen. An der Steuerung der $(Ca^{2+})_i$ sind mehrere Mechanismen beteiligt, von deren zeitlicher und räumlicher Koordination die Wirkung der nachfolgenden Calciumsignale abhängt (Bootman et al. 2001). Eine Erhöhung erfolgt über einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum sowie über eine Calciumfreisetzung aus internen Speichern, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Aufgrund des negativen Membranpotentials und des Konzentrationsgefälles von $0.1 - 0.3 \mu M$ (in Ruhe) intrazellulär versus $1.8 - 2 mM$ extrazellulär, respektive $1 mM$ intraretikulär, besteht ein sehr großer elektrochemischer Gradient. Beim Öffnen Calcium leitender Kanäle kommt es somit zum passiven Einstrom von Calcium ins Cytosol der Zelle (House et al. 2008). Gesenkt wird die $(Ca^{2+})_i$ durch aktiven Transport in den Extrazellulärraum, oder das Lumen des SR.

1.2.1 Calciumkanäle und ihre Funktionen

1.2.1.1 Calciumkanäle des SR

Durch hormonelle Stimulation plasmamembranärer $G_{q/11}$ gekoppelter Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β). Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Berridge and Irvine 1984). IP_3 kann, als wasserlösliche Substanz, zur Membran des SR diffundieren und dort die IP_3 -Rezeptoren aktivieren (IP_3R). Diese setzen daraufhin große Mengen Calciums frei. Sie verknüpfen somit die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern mit der extrazellulären Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Berridge 1993). Die IP_3 -Rezeptoren liegen in drei unterschiedlichen Isoformen vor, die entsprechend als IP_3R1 , IP_3R2 und IP_3R3 bezeichnet werden. Sie weisen dabei eine Sequenzhomologie von $60 - 70 \%$ auf (Furuichi and Mikoshiba 1995), wobei der am besten untersuchte Vertreter IP_3R1 ist. Sie bestehen aus je vier porenformenden Untereinheiten von circa $300 kDa$. Ihre Lokalisation ist zum allergrößten Teil in der Membran des SR gegeben (Takei et al. 1994). Eine Aktivierung erfolgt durch Bindung von IP_3 an alle vier Untereinheiten. IP_3 -Rezeptoren besitzen zudem Bindungsstellen für Calcium, die deren Affinität für IP_3 erhöhen, wohingegen hohe $(Ca^{2+})_i$ inhibierende Wirkung haben (Marchant and Taylor 1997; Taylor 1998). So führt aber auch die allosterische Bindung von ATP zu einer Kanalöffnung (Patel et al. 1999). Im glatten Muskel sind abhängig vom Gewebe meist alle drei Isoformen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander zu finden. Beim Vergleich von IP_3R1 defizienten Mäusen mit IP_3R2 , IP_3R3 und $IP_3R2/3$ Doppel KO Mäusen, wurde die dominierende Rolle von IP_3R1 bei der Calciumfreisetzung zur Glattmuskelkontraktion gezeigt (Zhou et al. 2008). IP_3R2 und 3 haben hierbei eher modulatorische Funktion auf die Qualität des Calciumsignals (Morel et al. 2003). Vor allem in tonischen glatten Muskeln stellt die IP_3 vermittelte

Calciumfreisetzung in den tiefen Kompartimenten des SR den Hauptteil des für die Kontraktion benötigten Calciumanstiegs (Wray et al. 2005).

Strukturell eng verwandt mit den IP_3 -Rezeptoren sind die Ryanodinrezeptoren (RyR). Diese setzen sich ebenso aus vier Untereinheiten zusammen und liegen ebenfalls in drei Isoformen vor. Bei einem Molekulargewicht von circa 565 kDa pro Untereinheit sind sie allerdings deutlich größer als die IP_3 -Rezeptoren (Takeshima et al. 1989). Ihre Verteilung in unterschiedlichen glattmuskulären Geweben schwankt stark, für vaskuläre Muskulatur werden überwiegend Isoform 2 und 3 beschrieben (Berra-Romani et al. 2008). Sie werden durch erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen aktiviert und sind maßgeblich an der Calcium vermittelten Calciumfreisetzung (CICR) beteiligt. Ihre Wirkung hängt dabei stark von ihrer räumlichen Anordnung zu anderen Strukturen ab. So können sie zum globalen Anstieg der Calciumkonzentration beitragen und somit zur Exzitations-Kontraktions-Kopplung, können aber auch durch Aktivierung von Calcium abhängigen Kaliumkanälen zum Abbruch des Calciumeinstroms führen (Kamishima and Quayle 2003). Ihre Aktivierbarkeit durch Calcium wird durch die Bindung von Koffein erhöht, zudem werden sie durch zyklische ADP-ribose, einem weiteren 'second messenger', aktiviert. RyR weisen Bindungsstellen für sowohl Calmodulin, wie auch Calcium-Calmodulin auf, wodurch ihre Aktivität moduliert wird (Ozawa 2010).

Sowohl IP_3 -Rezeptoren, wie auch Ryanodinrezeptoren gemeinsam ist die Eigenart zur Clusterbildung. Hierbei finden sich mehrere Kanäle an einer Stelle des SR zusammen. Durch Aktivierung des Clusters entstehen sehr hohe lokale Calciumkonzentrationen, die durch den Konzentrationsgradienten zum umliegenden Cytosol rasch diffundieren und somit nur von kurzer Dauer sind. Gehen diese von Ryanodinrezeptoren aus werden sie als Spark bezeichnet, das IP_3 -Rezeptor Analogon als Puff. Ihr Auftreten korreliert eng mit dem Füllungszustand des SR. Bei mit Calcium gefüllten SR treten sie gehäuft spontan im Ruhezustand auf (Berridge 2008). Treten Sparks in unmittelbarer Nähe eines Calciumabhängigen Kaliumkanals auf führt dies zur Öffnung desselbigen. Der daraus resultierende Auswärtsstrom von Kaliumionen wird als STOC (spontaneous transient outward current) bezeichnet und führt zur Hyperpolarisation und damit zur verminderten Erregbarkeit der Zelle. Befindet sich ein Calciumabhängiger Chloridkanal in räumlicher Nähe des Spark resultiert hieraus ein Ausstrom von Chlorid, was zur Erhöhung des Ruhemembranpotentials und zur vermehrten Erregbarkeit der Zelle beiträgt. Der resultierende Strom wird als STIC (spontaneous transient inward current) bezeichnet (Wray, Burdyga et al. 2005).

1.2.1.2 Plasmamembrankanäle

Plasmamembrankanäle können anhand des aktivierenden Stimulus in drei Gruppen eingeteilt werden: Man unterscheidet hierbei spannungsabhängigen Calciumeinstrom

(VOCE), Rezeptor gesteuerten Calciueinstrom (ROCE) und durch Entleerung des SR aktivierten Calciueinstrom (SOCE).

Von den spannungsabhängigen Calciumkanälen wurden bisher sechs verschiedene Gruppen beschrieben. Sie formen sich aus fünf Untereinheiten. Unterschiede in der als $\alpha 1$ bezeichneten Untereinheit bedingen hierbei die Unterschiede zwischen den Isoformen. Im glatten Muskel besitzen nur T und L-Typ Kanäle (speziell CaV1.2) Bedeutung (Akata 2007a). Sie werden aktiviert über eine Depolarisation der Membran. T-Typ Calciumkanäle weisen geringe Leitfähigkeiten auf, aktivieren bereits bei geringer Depolarisation und inaktivieren rasch. Der durch sie vermittelte Calciumanstieg ist gering und dient eher der Modulation nach geschalteter Signalkaskaden (Missiaen et al. 1992). L-Typ Calciumkanäle benötigen positivere Membranpotentiale zur Aktivierung und zeichnen sich durch sehr hohe Leitfähigkeiten und langsame Deaktivierung aus (McDonald et al. 1994). CaV1.2 vermittelt vor allem in phasischen glatten Muskeln den Hauptteil des zur Kontraktion benötigten globalen Calciumanstiegs.

Relativ neu etabliert ist die Gruppe der Orai Proteine, diese umfassen drei Isoformen (Mercer et al. 2006). Der Orai vermittelte Calciueinstrom ist dabei sehr selektiv. Um ihre Kanalfunktion zu erfüllen, müssen Orais Tetramere bilden (Mignen et al. 2008). Aktiviert wird Orai durch 'Stromal interacting molecule' (STIM1). STIM1 ist dabei ein dimeres Molekül in der Membran des SR. Auf seiner luminalen Seite besitzt es eine EF-Hand Domäne. Diese Domänen binden Calcium. Bei einem Abfall des SR Calciums unter 300 μM , was einer Entspeicherung entspricht, dissoziiert der STIM1-Calcium-Komplex, wodurch mehrer STIM1 Dimere in so genannte Punctae zusammengelagert werden. STIM1 dient somit als Calciumsensor (Liou et al. 2005; Cahalan 2009). Durch die Multimerisierung kommt es zur Translokation in plasmamembrannahe Kompartimente des SR (Wu et al. 2006), was wiederum zur Rekrutierung von Orais, zur Tetramerbildung und zum Calciueinstrom führt. Orais sind also reine SOCE Kanäle (Potier and Trebak 2008). Der durch SOCE verursachte Calciueinstrom dient in erster Linie der Wiederbefüllung des SR, kann aber auch zur Kontraktion der glatten Muskulatur beitragen (Parekh and Putney 2005). SOCE vermittelte Calciumsignale werden aber auch mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht (Munoz et al. 2011).

Eine weitere Gruppe von Plasmamembrankanälen stellen die Transient receptor potential (TRP) Kanäle dar. Diese Gruppe von Proteinen umfasst sechs Familien und dreißig bislang beschriebene Isoformen. Ihre Kanalfunktion erlangen sie durch Zusammenlagerung von je vier Untereinheiten, wobei alle Untereinheiten sechs Transmembrandomänen umfassen. Hierbei sind sowohl Homomere aus gleichen Einheiten wie auch heteromere Kanalbildungen möglich. Als bedeutend für den glatten Muskel hat sich vor allem die Familie der klassischen TRP (TRPC) Kanäle erwiesen

(Earley and Brayden 2010). Diese umfasst sieben Mitglieder, die aufgrund ihrer Homologien untereinander in vier Gruppen (TRPC3/6/7, TRPC4/5, TRPC1 und TRPC2) eingeteilt werden (Vazquez et al. 2004). Bei Aktivierung bedingen die TRPC Kanäle einen sehr unselektiven Ionenstrom von Natrium und Calcium ins Cytosol. Hierdurch tragen sie vermutlich zur Aktivierung des VOCE bei. Ihre Aktivierbarkeit ist dabei weitgehend unabhängig vom Membranpotential (Earley and Brayden 2010). Die Aktivierung beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen, ist aber nicht abschließend geklärt. So können einige Isoformen durch DAG aktiviert werden und sind somit am ROCE beteiligt. Demgegenüber steht eine Aktivierung durch SR Entleerung und eine Beteiligung am SOCE. Welche Isoformen hierbei als ROCE und welche als SOCE fungieren wird nach wie vor untersucht. So galt TRPC1 bislang als SOCE Kanal, jedoch zeigten Gefäßmuskelzellen der TRPC1 KO Maus keinen verminderten SOCE (Dietrich et al. 2007). Für TRPC 4 und 5 konnte eine Aktivierung durch DAG gezeigt werden, die an die Inhibierung der Proteinkinase C gebunden war (Venkatachalam et al. 2003). Von (Wang et al. 2004) wurde aber auch eine Beteiligung von TRPC4 am SOCE in Mesangialzellen gezeigt. Zudem wurde bei der Untersuchung der TRPC4 KO Maus ein verminderter SOCE in den Endothelzellen der Aorta nachgewiesen (Freichel et al. 2001). Ebenso galten TRPC3/6 und 7 als ROCE Kanäle aufgrund ihrer Aktivierbarkeit durch DAG. In DT 40 Zellen wurde jedoch in Abhängigkeit vom Expressionslevel eine Aktivierbarkeit von TRPC3 durch entweder SR Entleerung oder DAG nachgewiesen (Vazquez et al. 2003). TRPC3 operierte bei hohem Expressionslevel als ROCE Kanal, bei geringer Expression als SOCE Kanal. Eine kürzlich generierte TRPC3 KO Maus zeigte zudem einen um 50% erniedrigten SOCE in den Acini des Pankreas (Kim et al. 2009). Eine abschließende Beurteilung, welche Isoform wodurch aktiviert wird, fällt hierdurch schwer. Darüber hinaus können sich die Eigenschaften auch in Abhängigkeit der Heterotetramerbildung ändern (Birnbaumer 2009). Zudem ist bislang der mechanistische Zusammenhang zwischen SR Entleerung und TRPC Aktivierung nicht abschließend geklärt.

1.2.1.2.1 Der SOCE

Der SOCE wurde ursprünglich als hochselektiver Calciumstrom nach SR Entleerung durch Patchclamp Experimente detektiert und als I_{CRAC} bezeichnet (Parekh and Putney 2005). Kürzlich konnte dieser Strom dem durch Orai verursachten Calciumeinstrom zugeordnet werden (Peel et al. 2008). Im Zusammenhang mit der SR Entleerung wurden aber auch verschiedene andere, nichtselektive Kationenströme beschrieben (McDaniel et al. 2001; Leung et al. 2008), denen bislang keine Kanalproteine zugeordnet werden konnten. Eine Rolle der TRPC Kanäle gilt hierbei als wahrscheinlich, ist aber nicht abschließend etabliert (Salido et al. 2009). Neben den TRPC Kanälen, STIM1 und Orai wird aber auch die Beteiligung weiterer Proteine am SOCE diskutiert. Offenbar werden

durch die Translokation der STIM1 Multimere zur Plasmamembran, neben Orai, weitere Proteine rekrutiert, die dann in speziellen Membranabschnitten, den 'lipid rafts', makromolekulare Signalkomplexe bilden. So liegen Berichte über eine Interaktion von STIM1 und Orai mit TRPC Kanälen, speziell TRPC1, vor (Jardin et al. 2008; Liao et al. 2008; Liao et al. 2009). So wurde aber auch von einer Interaktion von Natrium/Calcium-Austauschern (NCX) und Orai berichtet (Baryshnikov et al. 2009). Zudem zeigten (Sampieri et al. 2009) eine Kollokalisierung der SR Calcium-ATPase 2 (SERCA2) und STIM1.

Neben der Aktivierung des SOCE durch STIM1 liegen auch Hinweise auf weitere Aktivierungsmechanismen vor. So wurde durch die SR Entspeicherung bedingt die Entstehung eines nicht näher definierten und als calcium induced factor (CIF) bezeichneten Botenstoffes nachgewiesen, der entweder direkt, oder über eine Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) den SOCE auslöst (Putney 2001; Smani et al. 2004; Bolotina 2008). Die Aktivierung der PLA2 erfolgt hierbei durch die Verdrängung des inhibierenden CaM aus seiner Bindung durch CIF. Zudem wird die Möglichkeit der Speicherung der SOCE Kanäle in Vesikeln unterhalb der Plasmamembran postuliert. Durch die SR Entleerung könnten diese mit der Plasmamembran verschmelzen, wodurch die Kanäle in die Membran eingebaut werden (Cheng et al. 2011)

1.2.2 Calciumtransporter

Wesentlichen Anteil an der Senkung der intrazellulären Calciumspiegel besitzen die ATP abhängigen Calciumpumpen. Nach ihrer Lage in der Plasmamembran, beziehungsweise dem SR unterscheidet man Plasmamembran-Calcium-ATPasen (PMCA), respektive SR Calcium-ATPasen (SERCA). SERCA existieren in drei Isoformen, die alle durch Thapsigargin irreversibel gehemmt werden können (Lytton et al. 1991). Isoform 2 existiert durch unterschiedliches Splicen in den Varianten a und b, wobei im glatten Muskel hauptsächlich SERCA 2a zu finden ist. Diese transportiert in Gegenwart von Magnesium unter Verbrauch von einem Molekül ATP zwei Moleküle Calcium ins Lumen des SR. Dies passiert im Austausch gegen Protonen. Bei gefülltem SR wird ihre Aktivität durch Phospholamban durch Verminderung der Affinität zu Calcium gehemmt. CalciumCaM-Kinase II verstärkt ihre Aktivität (Misquitta et al. 1999). Durch ihre Aktivität haben sie zudem entscheidenden Einfluss auf den Füllungsstatus des SR und somit die Qualität von Calciumsignalen (Camacho and Lechleiter 1993). Durch ihre Lokalisation in der äußeren Membran der Kernhülle kommt ihnen auch eine Bedeutung bei der Regulation intranukleärer Calciumsignale zu (Misquitta, Mack et al. 1999).

Die PMCA existieren in vier Isoformen und zahlreichen Splice Varianten, die sich durch unterschiedliche Pumpleistungen und Kinetiken auszeichnen. Sie bestehen aus zehn Transmembrandomänen und werden durch die Bindung von CalciumCaM aktiviert. Durch

die Bindung kommt es zur Konformationsänderung, wodurch die Inhibierung der katalytischen Domäne durch den C-Terminus aufgehoben wird (Strehler et al. 2007). PMCA binden Homer, was ihre Beteiligung an Signalkomplexen innerhalb der Plasmamembran ermöglicht (Sgambato-Faure et al. 2006). Sie pumpen ein Molekül Calcium unter Verbrauch von einem Molekül ATP im Austausch gegen ein oder zwei Protonen. Durch Interaktion mit zahlreichen Proteinen über ihre PDZ Domäne, ihrer Lokalisation in Caveolen, den relativ geringen Transportkapazitäten und der hohen Selektivität für Calcium liegt ihre Funktion eher in der Feinregulation von Calciumsignalen (Brini and Carafoli 2009).

Die drei Familien der Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) besitzen zwar eine geringere Affinität für Calcium als die ATPasen, dafür ist ihre Transportkapazität 10- bis 50-mal höher. Sie transportieren in einem elektrogenen Prozess drei Natriumionen gegen ein Calciumion. Ihre Aktivität ist neben dem Membranpotential vor allem vom Natrium- und Calciumgradienten über der Membran abhängig und kann bei hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen, zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch eine Umkehr des Transportprozesses beitragen (Blaustein and Lederer 1999).

1.3 Der NO/cGMP/cGK Signalweg

1998 wurde für die Aufklärung der NO/cGMP Signalkaskade nach über 25 Jahren Forschung der Nobelpreis für Medizin an die Herren Ferid Murad, Robert Furchgott und Louis Ignarro verliehen (Raju 2000). Der NO/cGMP/cGK Signalweg steht aufgrund seiner hohen pharmakologischen Relevanz im Focus des wissenschaftlichen Interesses. So finden viele Pharmaka des Herzkreislaufsystems hier ihre Angriffspunkte.

NO wird durch Stimulation der NO-Synthasen (NOS) durch verschiedenste Stimuli wie Neurotransmitter, Hormone, Scherstress oder aber auch Calcium-Calmodulin aktiviert. Bislang sind drei NOS bekannt: Die neuronale (NOS1), die induzierbare (NOS2) und die endotheliale (NOS3) (Forstermann et al. 1991). Nach Aktivierung katalysieren diese in Gegenwart des Kofaktors BH_4 die Oxidation von L-Arginin zu N-Hydroxyarginin und schließlich den Abbau zu L-Citrullin und NO (Alp and Channon 2004). NO ist als gasförmige Substanz sehr membrangängig, diffundiert folglich schnell innerhalb von Geweben, und ist als freies Radikal von begrenzter Lebensdauer. In Abhängigkeit von der Konzentration und dem Bildungsort entfaltet NO unterschiedlichste Wirkungen. Die induzierbare NOS zum Beispiel wird vornehmlich von Zellen der unspezifischen Immunabwehr exprimiert. Durch Entzündungsmediatoren wird diese verstärkt exprimiert, so dass am Ort der Entzündung das bis zu 1000 fache der regulären NO Konzentration herrscht. Durch die Bildung von Peroxynitrit und Superoxid ist NO in diesen Konzentrationen außerordentlich toxisch und somit an der Immunabwehr beteiligt. Die

konstitutiv exprimierten NOS Isoformen 1 und 3 sind in ihrer Aktivierbarkeit Calcium abhängig und kommen in vielen unterschiedlichen Geweben vor (Forstermann and Munzel 2006). Sie regulieren dabei so vielfältige Aufgaben wie die gastrointestinale Motilität (Rand and Li 1995) Thrombozytenadhäsion und –aggregation, Neurotransmission an Synapsen, Proliferation von Muskelzellen und nicht zuletzt den Tonus der Gefäßmuskulatur (Hofmann et al. 2006). NO wird hierbei, zum Beispiel durch Scherbelastung bei erhöhtem Blutdruck oder durch Calcium-Calmodulin nach Neurotransmitterstimulation, in den Endothelzellen der Gefäße durch NOS3 gebildet. Nach Diffusion in die Gefäßmuskelzelle senkt es dort den Tonus über die Bildung von cGMP. Die Bildung von zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) in der glatten Muskelzelle erfolgt hierbei im Cytosol über die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Diese ist ein dimeres Molekül mit einer α und einer β Untereinheit, wobei je 2 α und je 2 β Untereinheiten existieren. An die β Untereinheit assoziiert ist eine Häm-Gruppe mit einem zentralen Eisenion. Liegt dieses im reduzierten Fe^{2+} Zustand vor kann NO binden. Durch die Bindung kommt es zur Aktivierung und folglich zur Bildung von cGMP aus GTP (Garthwaite 2010). Neben der löslichen GC existiert eine zweite membranständige Form, die partikuläre GC. Bislang sind beim Menschen fünf Isoformen der pGC beschrieben. Diese werden neben Guanylin, Uroguanylin und hitzestabilem Enterotoxin vor allem durch die natriuretischen Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid), BNP ('brain derived natriuretic peptide') und CNP ('C-type natriuretic peptide') aktiviert und katalysieren daraufhin ebenfalls die Katalyse von GTP zu cGMP (Potter 2011).

Die Wirkung von cGMP innerhalb der Muskelzelle beruht vornehmlich auf drei Mechanismen. Zum einen fördert es durch die Aktivierung von Phosphodiesterase 5 (PDE 5) seinen eigenen Abbau im Sinne eines autoregulativen Mechanismus. PDE bauen zyklische Nukleotide zu ihren 5'-Analoga ab und beenden damit ihre Wirkung. Insgesamt sind 11 verschiedene Familien beschrieben, mit unterschiedlichen Affinitäten für cAMP, cGMP oder beide Nukleotide. Im glatten Muskel wurden bisher PDE 1/3/4 und 5 beschrieben. PDE 5 baut hierbei hochselektiv cGMP ab. Daneben kann es aber auch zu einer Kreuzaktivierung des cAMP Signalweges durch Blockade von PDE3 kommen (Francis et al. 2010).

Daneben besteht die Möglichkeit zur Aktivierung zyklischer-Nukleotid-aktivierter Kationenkanäle (CNG). Dieser Mechanismus spielt allerdings im glatten Muskel eine eher untergeordnete Rolle (Biel 2009).

Der sicherlich weitest reichende Effekt innerhalb der Muskelzelle ist die Aktivierung der cGMP-abhängigen-Protein-Kinase (cGK). Diese Serin/Threoninkinase verursacht über eine Vielzahl von Substratphosphorylierungen eine Tonusreduktion der Gefäßmuskelzellen (Schlossmann et al. 2003).

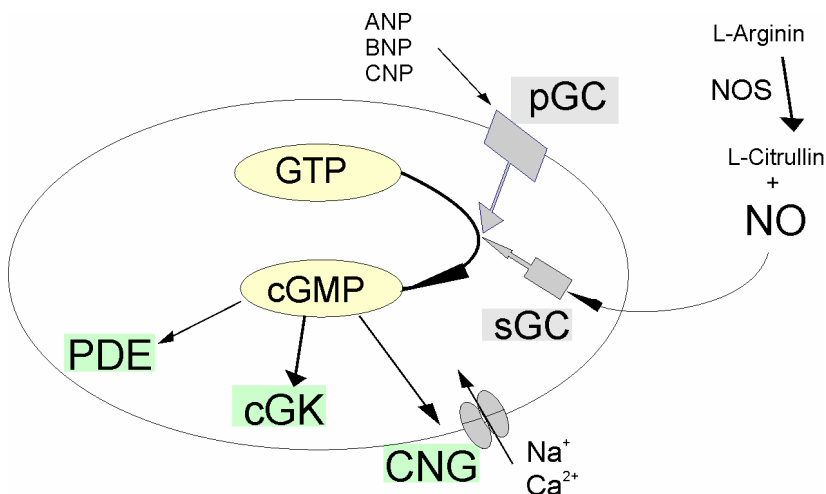


Abbildung 1: Bildung und Wirkung von cGMP

NO wird aus L-Arginin durch NO-Synthasen gebildet und stimuliert daraufhin über die Aktivierung der sGC die Bildung von cGMP aus GTP. Alternativ führt die Stimulation der pGC durch die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP ebenso zur Bildung von cGMP. cGMP vermittelt seine Effekte über Aktivierung der PDE, der CNG und der cGK.

1.3.1 Die cG-Kinasen

Die cGK existieren in zwei verschiedenen Isoformen die sich von zwei verschiedenen Genen ableiten. Prkg1 codiert hierbei für cGK1, prkg2 entsprechend für cGK2. Das Molekulargewicht für cGK1 liegt bei etwa 76 - 78 kDa, das für cGK2 bei 86 kDa. Durch alternatives Splicing wird cGK1 in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert, cGK1 α und cGK1 β , die sich in ihrem N-terminalen Bereich um circa 100 Aminosäuren unterscheiden. Dieser N-terminale Bereich enthält auch die Leucin-Zipper Domäne, mit deren Hilfe die Kinasen ihre zellulären Zielstrukturen binden, so dass sich durch die unterschiedlichen N-Termini verschiedene Substratspezifitäten und Lokalisationen ergeben (Hofmann et al. 2000). Über die N-Termini bilden die Kinasen zudem Homodimere aus. Im N-Terminus ist zudem die autoinhibitorische Domäne lokalisiert. Die katalytische Domäne weist zwei cGMP Bindungsstellen auf. Für eine vollständige Aktivierung der Homodimere ist ein Besatz aller vier Bindungsstellen nötig. C-terminal gelegen befinden sich die Substratbindungsdomäne und die katalytische Domäne die letztendlich den γ -Phosphattransfer vollzieht (Hofmann et al. 2009). In Gegenwart von cGMP sind zudem N-terminal Autophosphorylierungen zu beobachten, die zu einer gesteigerten Enzymaktivität und cGMP Affinität führen (Smith et al. 1996), zum Teil aber auch, im Sinne einer Autoregulation, die Ubiquitinierung bedingen, wie für cGK1 α gezeigt (Dey et al. 2009). Während cGK1 als lösliche Kinasen im Cytosol lokalisiert sind, weist cGK2 eine Myristoylierung auf, welche sie stabil an der Zellmembran verankert. cGK2 kommt in vielen Teilen des Gehirns und in sezernierendem Gewebe vor. So wurde über cGK2 in der Niere (Gambaryan et al. 1996), der Darmmukosa und der Lunge berichtet (Vaandrager et al. 1997; Hofmann, Bernhard et al. 2009). Durch die Interaktion mit dem Chloridkanal Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) erhöht cGK2

die Chloridsekretion und konsekutiv den Fluss von Wasser über die Membran und beeinflusst zudem das Knochenwachstum (Pfeifer et al. 1996). Überdies konnten (Wagner et al. 1998) noch die Hemmung der Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere durch cGK2 nachweisen.

cGK1 α ist die vorherrschende Variante in Lunge, Herz und Cerebellum, cGK1 β hingegen ist die alleinige Isoform in humanen Thrombozyten und die dominante Isoform in der Blase und Uterus. In den meisten glattmuskulären Organen des Gastrointestinaltrakts (GIT) und der Aorta kommen beide Isoformen vor, mit Präferenz für cGK1 β (Geiselhöringer et al. 2004a).

1.3.1.1 Substrate der cGK1

cGK1 weist eine Vielzahl von Substraten im ZNS, dem Herzen, den Nieren, Thrombozyten und in Immunzellen auf (Schlossmann and Desch 2009). Ihre Wirkung im glatten Muskel ist überwiegend relaxierend und antiproliferativ. Dies beruht auf der synergistischen Modulation mehrerer verschiedener Mechanismen (siehe hierzu auch Abbildung 2). Zur Relaxierung werden hierbei sowohl Calcium abhängige, wie auch unabhängige Mechanismen beeinflusst. So wurde bisher eine Phosphorylierung von Phospholamban nachgewiesen. Durch Phosphorylierung an Serin 16 wird die inhibierende Wirkung auf SERCA aufgehoben. Daraus resultiert eine verstärkte Aufnahme von Calcium ins SR (Lalli et al. 1999; Koller et al. 2003).

Die Rezeptorvermittelte Bildung von IP₃ wird durch zwei Mechanismen unterdrückt. Durch Phosphorylierung von Phospholipase C β (PLC β) an zwei Stellen wird deren Aktivität vermindert (Xia et al. 2001). Zudem phosphoryliert cGK1 α den Regulator of G Protein (RGS) 2. In phosphorylierter Form bindet dieses Protein an die α_q Untereinheit der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und verstärkt deren GTPase Aktivität, so dass es bei Rezeptorstimulation zu einer verminderten Signalweiterleitung kommt (Huang et al. 2007; Osei-Owusu et al. 2007).

Calciumeinstrom wird durch die Phosphorylierung des BK-Kanals unterdrückt (Sausbier et al. 2000). Hierdurch kommt es zur Hyperpolarisation der Membran, wodurch der spannungsabhängige Calciumeinstrom unterdrückt wird.

Durch die Phosphorylierung von IP₃-Rezeptor-assoziiertem-cGKinase-Substrat (IRAG) durch cGK1 β wird der IP₃R1 inhibiert, wodurch es zur verminderten Freisetzung von Calcium aus dem SR kommt (Schlossmann et al. 2000; Ammendola et al. 2001).

Neben der aktiven Senkung der Calciumspiegel, bewirkt cGK1 zudem eine Calciumdesensibilisierung der kontraktilen Elemente. Durch die Phosphorylierung von RhoA (Ellerbroek et al. 2003) wird die Aktivierung der ROCK unterdrückt. Durch eine direkte Phosphorylierung der MYPT1 an Serin 695 durch cGK1 α ist die

Inhibitionsphosphorylierung durch ROCK an Threonin 696 sterisch inhibiert (Wooldridge, MacDonald et al. 2004).

Die antimigratorische, differenzierende Wirkung der cGK1 beruht zum einen auf einer Modulation des Cytoskeletts, zum anderen auf einer Veränderung der Genexpression. So stellt das Vasodilator-stimulierte-Phosphoprotein (VASP) ein Substrat der cGK1 dar. Durch die Phosphorylierung von VASP an Serin 239 hat cGK1 über die Modulation des Aktin-Cytoskeletts einen proliferationshemmenden Effekt auf glatte Muskelzellen (Chen et al. 2004). Über eine Phosphorylierung von CRP4 durch cGK1 wird ein kontraktiler, antiproliferativer Phänotyp der Muskelzellen durch die vermehrte Expression von α -Aktin, der schweren Kette des Myosin und Calponin gefördert (Zhang et al. 2007). Durch die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration kann zudem die Translokation des Transkriptionsfaktors 'nuclear factor of activated T-cells' (NFAT) in den Zellkern unterbunden werden. Hierdurch vermindert cGK1 die Expression proliferativer Proteine unter Kontrolle des NFAT (Koitabashi et al. 2010).

Über eine Phosphorylierung von PDE 5 bewirkt cGK1 einen schnelleren Abbau von cGMP und trägt somit zur eigenen Deaktivierung bei (Rybalkin et al. 2002).

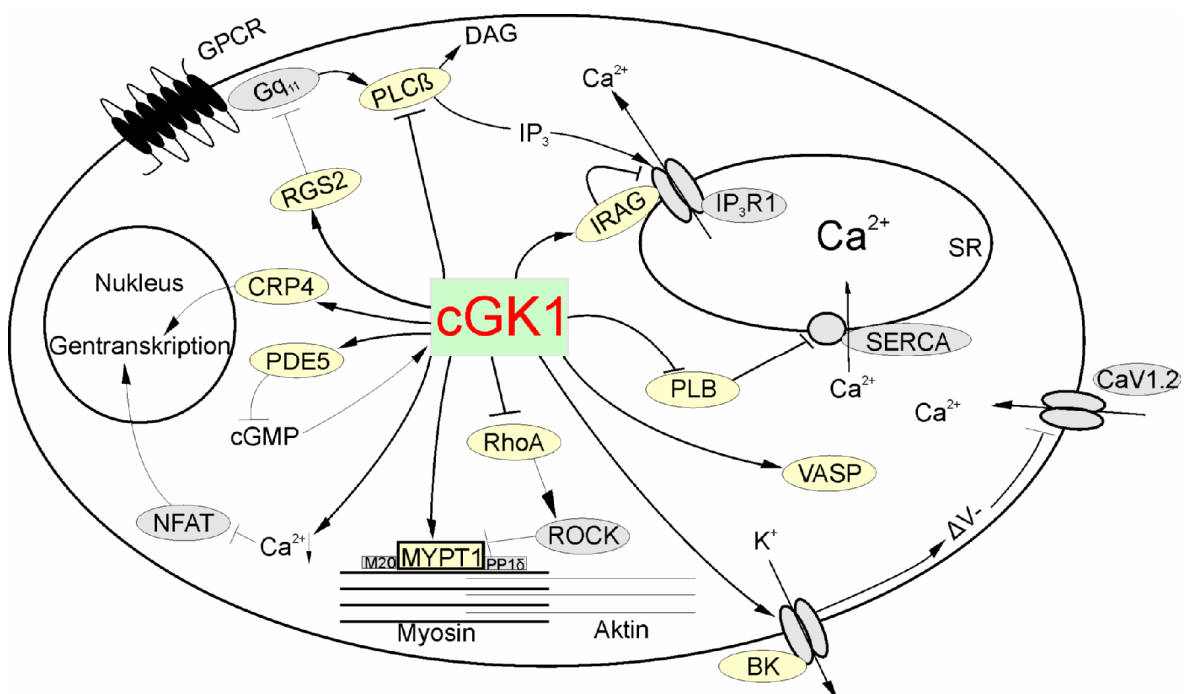


Abbildung 2: Substrate und Effektoren der cGK1 Signalkaskade im glatten Muskel

Direkte Substrate der cGK1 sind gelb hinterlegt, indirekte Effektoren sind grau hinterlegt. Pfeile zeigen einen fördernden Effekt an, Striche deuten einen hemmenden Mechanismus an. ΔV -bezeichnet eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Die genauen Zusammenhänge sind im Text beschrieben.

IRAG

IRAG wurde 2000 von Schlossmann und Kollegen entdeckt. Es weist ein Molekulargewicht von 125 kDa auf und ist aufgrund seiner C-terminalen Transmembrandomäne stabil in der Membran des Sarko/Endoplasmatischen Retikulums verankert. Über eine coiled coil Domäne ist es in der Lage an IP₃R1 zu binden. Am N-terminalen Bereich befindet sich die Bindungsstelle für cGK1 β , die mit ihrer N-terminalen Leucin Zipper Domäne diese Stelle bindet. Die cGK1 β abhängige Funktion von IRAG als Inhibitor der IP₃-Rezeptor vermittelten Calciumfreisetzung wurde zunächst an transfizierten Cos Zellen etabliert (Schlossmann, Ammendola et al. 2000; Ammendola, Geiselhoring et al. 2001). IRAG kommt in vielen Geweben vor, stark exprimiert insbesondere in glatten Muskeln und Thrombozyten (Geiselhoring, Gaisa et al. 2004a). Durch Deletion von Exon 12 im IRAG codierenden Gen konnte eine Maus generiert werden, deren mutiertes IRAG Protein durch das Fehlen der coiled coil Domäne nicht mehr an IP₃R1 binden konnte. Die IRAG Δ 12 Tiere zeigten einen starken gastrointestinalen Phänotyp und reagierten mit einer verminderten Relaxation glattnuskulärer Organe bei cGK Stimulation nach Hormon vermittelter Kontraktion. Dies wurde auf die veränderte Calciumfreisetzung zurückgeführt. cAMP vermittelte oder durch Depolarisation verursachte Effekte waren hiervon nicht betroffen (Geiselhoring et al. 2004b). Durch die Generierung einer IRAG KO Linie, durch Deletion von Exon 3, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Zudem konnte ein Einfluss von IRAG auf die Blutdruckregulation nach Sepsisinduktion gezeigt werden. KO Tiere zeigten hierbei keinen Blutdruckabfall im Gegensatz zu den WT Kontrollen. KO Tiere haben zudem eine stark vergrößerte Milz und versterben median nach 29 Wochen (Desch et al. 2010). Neben der Bedeutung im glatten Muskel wurde zudem der Einfluss von IRAG auf die Thrombozytenaggregation gezeigt (Antl et al. 2007; Schinner et al. 2011). (Yaroslavskiy et al. 2010) zeigten zudem die Funktion von IRAG für das Anheften von Osteoclasten am Knochen. Die Arbeitsgruppe um Frau Pilz postuliert zudem eine Rolle von IRAG in der Gentranskription. In transfizierten BHK Zellen verhinderte IRAG die cGMP vermittelte Translokation von cGK1 β in den Kern (Casteel et al. 2008). In weiteren Zellexperimenten zeigten (Masuda et al. 2010) eine Interaktion von IRAG auch mit IP₃R2 und IP₃R3. Eine Phosphorylierung von IRAG durch cGK1, führte auch hier zur verminderten Calcium Leitfähigkeit.

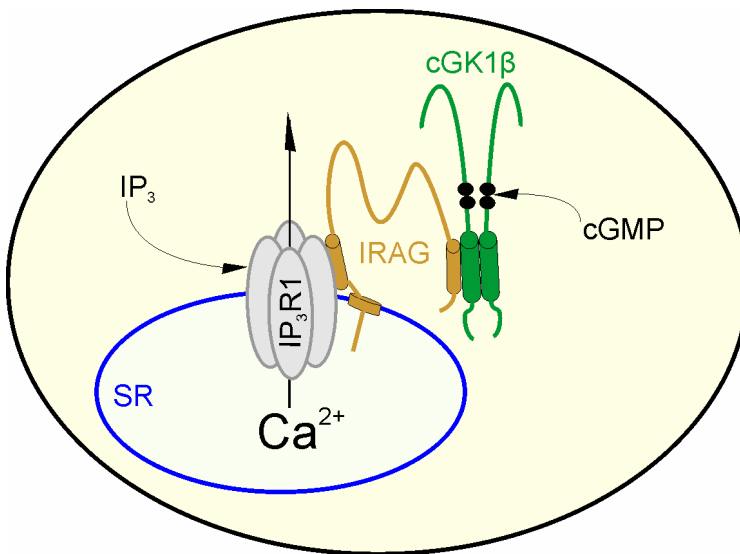


Abbildung 3: Darstellung des trimeren Komplexes

Die Abbildung zeigt den trimeren Komplex, in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR). IRAG ist im C-terminalen Bereich in der Membran des SR verankert und bindet über seine coiled coil Domäne an den IP₃-Rezeptor1 (IP₃R1). N-Terminal wird cGK1β über ihre Leucin-Zipper-Domäne in den Komplex eingebunden.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Vor allem im Hinblick auf ihr therapeutisches Potential im Bereich der Herz-Kreislauferkrankungen steht die NO/cGMP/cGK Signalkaskade im Interesse der Forschung. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist deshalb ein tief greifendes Verständnis dieser Kaskade essentiell. Besonders den Substraten der cG-Kinase kommt hier große Bedeutung zu, deren Funktion und Interaktion innerhalb dieser Kaskade die Glattmuskel relaxierenden Effekte größtenteils vermitteln.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Funktion des cG-Kinase assoziierten Substrates IRAG vor allem im Hinblick auf die Regulation der Calciumhomöostase im glatten Muskel am Modell der KO Maus zu untersuchen. So sollte zunächst geklärt werden, wie sich das Fehlen von IRAG auf seine Interaktionspartner auswirkt. Hierzu sollten glattmuskuläre Organe hinsichtlich einer veränderten Expression der IP₃-Rezeptoren und cGK1 per Immunblot untersucht werden, um Rückschlüsse auf etwaige Kompensationsmechanismen ziehen zu können. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich der IRAG knockout auf die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine auswirkt. Hierzu sollte per Immunfärbungen an vaskulären glatten Muskelzellen auch die Auswirkungen einer Stimulation des NO/cGMP/cGK Signalweges untersucht werden.

Durch die Charakterisierung eines früheren Mausmodells (IRAG Δ12), einer IRAG Deletionsmutante, der die Bindungsdomäne für IP₃R1 fehlt, konnte bereits die Bedeutung der Interaktion von IRAG mit IP₃R1 für die Calciumregulation im glatten Muskel gezeigt werden. Während in vaskulären glatten Muskelzellen aus WT Tieren die durch adrenerge

Stimulation vermittelte Calciumfreisetzung in Gegenwart von 8 Br-cGMP inhibiert werden konnte, war diese Inhibierung in Zellen aus IRAG Δ 12 Mäusen nicht mehr gegeben. Da die IRAG Δ 12 Tiere aber noch immer einen verkürzten Teil des IRAG Proteins exprimieren, sollte anhand der IRAG KO Tiere geklärt werden, ob dieser Effekt auf der fehlenden Inhibierung des IP₃R1 durch IRAG beruht, oder durch das verbliebene IRAG Fragment verursacht wird. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Effekte auch bei der Generierung endogenen cGMPs durch die Guanylatzyklen erzielt werden können. Zudem sollte die Funktion von IRAG für den spannungsabhängigen Calciumeinstrom analysiert werden. Durch den engen funktionalen Zusammenhang aus Calciumfreisetzung und kapazitativem Calciumeinstrom sollte zudem die Wirkung des IRAG knockout auf diesen Mechanismus des Calciumeinstroms untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Bezeichnung/Hersteller
Absaugvorrichtung	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren D
Autoklaven	2540MK, Tuttnauer, Jerusalem, IL Varioklav H+P, Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Blotting Apparatur	Semi-dry-Elektroblotter, VWR International, Darmstadt, D
Brutschrank	Excella ECO-170, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D
Eismaschine	AF 100, Scotsman, Mailand, IT
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetracell, Biorad, München, D
Inkubator	Heizeinsatz P S1, Carl Zeiss, Jena, D Temp Module S1, Carl Zeiss, Jena, D
Ionentauscher	milli-Q water purification System, millipore, Schwalbach, D
Kameras	Axiocam MRm, Carl Zeiss, Jena, D IMAGO, T.I.L.L Photonics GmbH, Martinsried, D
Kühltechnik	9 6005 4 (4-8°C) & 4 6158 4 (-20°C), Liebherr, Salzburg, A Jouan VX 490, Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Lichtquellen	KL 1500 LCD (Kaltlicht), Carl Zeiss, Jena, D Polychrome IV, T.I.L.L Photonics GmbH, Martinsried, D HXP 120 (Fluoreszenzlampe), Carl Zeiss, Jena, D HAL 100 (Halogenlampe), Carl Zeiss, Jena, D
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Magnetschalter	LFAA1201710H; The Lee Co, Essex, CT
Mikromanipulator	MMJ-Z manuell, Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskope	LSM 510 & Axio observer Z1 & Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena, D Olympus CK2, Olympus, Hamburg, D
Operationsbesteck	FST, Bad Oeynhausen, D
pH Meter	^pH 526, WTW, Weilheim, D
Pipetten	Pipet lite Rainin, Mettler Toledo, Giessen, D
Photoentwickler	Cawomat 2000 IR, Cawo, Schrobenhausen, D
Photometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, D Tecan Sunrise Plattenleser, Tecan, Crailsheim, D
Schlauchpumpe	Reglo digital ISM 597, Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim, D
Schüttler	IKA KS 260 Basic, IKA Werke, Staufen, D Innova 2000 Plattform shaker, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D Überkopfschüttler M 2000, Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilbank	NU-425-400, NUAIRE, Plymouth, MN
Stromquellen	Power Pac 200, Biorad, München, D PS305T, Biometra GmbH, Göttingen, D Power Supply 23,1 Carl Zeiss, Jena, D
Vortexer	VWR International, Darmstadt, D
Waagen	Sartorius BP211 D (Analysenwaage), Sartorius, Göttingen, D Sartorius Extend (Feinwaage), Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	VWR Mod1112A, VWR International, Darmstadt, D
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, Superior, Marienfeld, D
Zentrifugen	Centrifuge 5417R und 5424, Eppendorf, Hamburg, D Tischzentrifuge und Vortex, Neolab, Heidelberg, D

Multifuge 1 L-R, Kendo Heraeus, Nürnberg, D JouanGR4i, Thermo Scientific, Karlsruhe, D

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte**2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Bezeichnung/Hersteller
12 Loch Multischalen	Nunc GmbH, Langenselbold, D
Deckglases (24 x 50 x 0.13mm)	VWR International, Darmstadt, D
Deckgläser (Ø 20 x 0.13mm)	VWR International, Darmstadt, D
Einmalhandschuhe, Latex	Semperit Technische Produkte, Wien, AUT
Falcon Gefäße	15 ml, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Kanülen	BD, Heidelberg, D
Kryo Gefäße	Nunc GmbH, Langenselbold, D
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger	BD Falcon Culture slides, BD Biosciences, Bedford, USA
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH, Wertheim, D
PE Schlauch (1.0 x 1.8 mm)	Bruno Kummer GmbH, Freiburg, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Photofilme	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München, D
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Immobilon, Millipore GmbH, Schwalbach, D
Reagiergefäß	1,5 ml, 2.0 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten	10 ml, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpelle	Feather, Nr. 11, Feather Safety Razor, Osaka, JP
Spritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, BD Plastipak, BD, Heidelberg, D
Tygon 3 Stopperschlauch	Ismatec Labortechnik GmbH, Wertheim, D
Whatmanfilter	GB001 Gel Blotting Papier, Whattmann, Düssel, D
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask 25, Sarstedt, Nümbrecht, D

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**2.1.3 Chemikalien und Kits**

Produkt	Hersteller
2-APB	Calbiochem, Darmstadt, D
8 Br-cGMP	Biolog, Bremen, D
Acrylamid/Bisacrylamid	Fluka ChemieGmbH, Buchs, CH
ANP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
APS	Fluka ChemieGmbH, Buchs, CH
Brilliant blue R	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromepholblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
BSA Fraktion V	Fluka ChemieGmbH, Buchs, CH
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Charybdotoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CO ₂	Linde AG, München, D
DEA-NO	Axxora GmbH, Lörrach, D
DMEM GlutaMax	Invitrogen, Darmstadt, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DTT	Gerbü, Gailberg, D
ECL detection kit	Amersham, München, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
EGTA	Merck, Darmstadt, D
Entwickler/Fixierer	Ernst Christian GmbH, Planegg, D

Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FCS	PAA, Laboratories, Cölbe, D
FLIPR membrane potential assay kit	Molecular devices
Flufenaminsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Fura-2-AM	Calbiochem, Darmstadt, D
Glucose, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycerol Mounting Medium	Dako, Hamburg, D
Glycerol 87%	AppliChem GmbH, Buchs, CH
HEPES	Merck, Darmstadt, D
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Kollagenase Typ F	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
MgSO ₄	Merck, Darmstadt, D
Macermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, D
MitoTracker Deep Red	Invitrogen, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	VWR International, Darmstadt, D
NaN ₃	Merck, Darmstadt, D
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nifluminsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NMDG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Norepinephrine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Papain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Penicilin/Streptomycin	PAA, Laboratories, Cölbe, D
PFA	Merck, Darmstadt, D
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Proteinaseinhibitor complete mini	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Thapsigargin	Enzo Lifesciences, Lörrach, D
Total Protein kit, micro Lowry	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris	USB Corporation, Cleveland, USA
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
ε-Aminohexansäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und kits

2.1.4. Antikörper und Farbstoffe

Antikörper	Wirt	Verdünnung		Hersteller
		WB	IC	
Anti-human Golgin 97	mouse		1:50	Invitrogen
cGKI α	rabbit	1:200	1:40	Eigenherstellung
cGKI α	rabbit	1:80	1:25	Eigenherstellung
cGKI β	rabbit	1:1000	1:50	Eigenherstellung
Desmin	goat		1:100	Santa Cruz

IP ₃ RI	rabbit	1:1000	1:250	abr bioreagents
IP ₃ RII	goat	1:100	1:200	Santa Cruz
IP ₃ RII	mouse	1:1000	1:125	BD Bioscience
IRAG	rabbit	1:500		Eigenherstellung
IRAG	guinea pig		1:1000	Eigenherstellung
IRAG	goat		1:500	Santa Cruz
Phospholamban	mouse		1:50	Dianova
P-IP ₃ RI (Ser1755)	rabbit		1:50	cell signaling
P-Phospholamban (Ser16)	goat		1:2000	Santa Cruz
P-VASP (Ser239)	mouse	1:200	1:40	Alexis
Serca 2	mouse		1:300	abr bioreagents
SM- α -Aktin	mouse		1:200	Beckman Coulter
VASP	rabbit	1:2500	1:500	Alexis
β -Aktin	rabbit	1:2500		ab cam

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper

WB = Westernblot, IC = Immuncytochemie

Antikörper	Konjugat	Wirt	Verdünnung	IC	Hersteller
			WB		
anti goat IgG	HRP	rabbit	1:5000		Santa Cruz
anti goat IgG	Cy2	donkey		1:400	jackson
anti goat IgG	Alexa 546	donkey		1:400	invitrogen
anti guinea pig	Cy3	donkey		1:400	dianova
anti mouse IgG	HRP	goat	1:10000		Sigma Aldrich
anti mouse IgG	Cy2	donkey		1:800	invitrogen
anti rabbit IgG	HRP	goat	1:50000		dianova
anti rabbit IgG	Alexa 647	donkey		1:400	Invitrogen
anti rabbit IgG	TRITC	donkey		1:400	dianova

Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

WB = Westernblot, IC = Immuncytochemie

Farbstoff	Verwendung	Konzentration	Hersteller
DAPI	Kernfärbung	0.2mg/ml	Zur Verfügung gestellt von Dr. Seifert
FLIPR	Membranpotentialfärbung	5 μ g/ml	Molecular Devices
Fura 2	Calciummessungen	3 μ M	calbiochem
MitoTracker	Mitochondrien-Färbung	500nM	invitrogen

Tabelle 6: Liste der verwendeten Farbstoffe

2.2 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse stammten aus dem zentralen Tierlaboratorium der Universität Regensburg. Hierbei gab es 2 Zuchten, zum einen aus konventioneller Haltung, zum anderen aus Barrierehaltung im SPF-Stall. Dabei wurden adulte Tiere nach Geschlechtern getrennt in Makrolon Käfigen gehalten, maximal 5 in Typ II Käfigen, maximal 12 in Typ III Käfigen. Zur Zucht wurde ein Männchen, im Alter von 8 Wochen -18 Monaten, zusammen mit 2 Weibchen, 12-30 Wochen alt, in Typ III Käfigen gehalten. Die Weibchen verblieben mit ihren Würfen in diesen Käfigen. Als Einstreu wurden autoklavierte Späne verwandt, die zum Teil durch Nestlets ergänzt wurden. Futter- und Wasserversorgung waren durchgehend gewährleistet und erfolgten *ad libidum*. Zur

Generierung der Versuchstiere wurden heterozygote Verpaarungen angesetzt, aus welchen zu je 25% IRAG KO (= Versuchstiere) und 25% WT (= Kontrolltiere) stammten. Der Genotyp wurde mittels PCR aus Schwanzbiopsien bestimmt. Für die Versuche wurden Tiere beiderlei Geschlechts, im Alter von idealerweise 8-12 Wochen verwandt, vorzugsweise Geschwisterpaare. Zusätzlich zu den IRAG KO Tieren kamen auch cGK1 α rescue Tiere zum Einsatz. Diese wurden auf dem Hintergrund von cGK1 KO Tieren generiert, denen glattmuskelspezifisch, unter Kontrolle von Promotor 22, die cGK1 α überexprimiert wurde (Weber et al. 2007). Alle Tiere wurden auf dem genetischen Hintergrund Sv/129 gezüchtet. Alle Versuche wurden gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen/FELASA durchgeführt.

2.3 Isolierung muriner Gewebe

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Mäuse auf einer Styroporunterlage fixiert und das Abdomen samt Thorax geöffnet. Nach Entfernen von Zwerchfell und Lungen wurde die Aorta vorsichtig frei präpariert, samt Herz vom Rückgrat abgelöst und anschließend in eiskalten, sterilen PBS überführt. Verwendung fand im Weiteren der absteigende Ast der Aorta, vom Aortenbogen bis zum Abzweig der Nierenarterien. Dieser wurde unter dem Mikroskop von Fett und anhaftendem Bindegewebe sowie intravasalem Blut befreit.

Der Magen wurde im Ganzen entfernt und in eiskaltem PBS unter dem Mikroskop zerkleinert, vom Inhalt befreit und gesäubert.

Bei Jejunum und Colon wurde nach Extraktion der Inhalt durch Spülen mit eiskaltem PBS mittels einer 10 ml Spritze entfernt und anhaftendes Gewebe mit einer Augenschere abpräpariert.

Die Blase wurde gegebenenfalls entleert und ebenso wie die Uteri am Stück herauspräpariert. In eiskaltem PBS wurde auch hier Fett und Bindegewebe unter dem Mikroskop entfernt.

2.3.1 Gewebeaufschluss

Die unter 2.3 gewonnen Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sodann wurden größere Teile, wie sie bei den Geweben des Gastrointestinaltrakts vorlagen, in Frischhaltefolie gepackt und mit einem Hammer zerkleinert. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurden die gefrorenen Teile in einem Mörser weiter zerkleinert. Hierbei wurden Mörser und Pistill zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt, um ein Antauen der feinen Gewebestücke zu vermeiden. Um ein 'Herausspringen' von Gewebe während des Mahlens zu verhindern, war der Mörser mit Frischhaltefolie bedeckt. Die auf diese Weise zerkleinerten Gewebe wurden in vorgewogene Eppendorfcups überführt und das Gewicht

derselben durch Rückwiegen bestimmt. Anschließend wurde der Ansatz mit der vierfachen Menge des Eigengewichts mit Lysepuffer versetzt und sofort wieder gefroren. Der eigentliche Aufschluss wurde mit einem passgenauen Stößel in den Eppendorf Cups durchgeführt. Das Gemisch aus Lysepuffer und Gewebe wurde dabei mehrmals zerstoßen, und eingefroren, wobei ein Auftauen des Gemisches unbedingt vermieden wurde. Nachdem sich ein homogenes Gemenge ergab, wurde dieser Ansatz im Eisbad aufgetaut und bei 4°C für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (13000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Volumen bestimmt und mit 1/7 des Volumens an Proteinaseinhibitor (Roche complete mini) versetzt, um Abbauprozesse zu unterbinden. Nach dem Aliquotieren wurde Schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

PBS	Inhaltsstoff	Menge (mM)	Lysepuffer	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.4	NaCl	135	pH 7.4	SDS	2%
	KCl	3		Tris	50 mM
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8		Aqua bidest	
	KH ₂ PO ₄	2			
	Aqua bidest				

2.3.2 Gewinnung und Kultivierung primärer glatter Muskelzellen

Die Aorten (Gewinnung siehe 2.3) von je 2-4 IRAG KO und WT Mäusen wurden zerkleinert und enzymatisch verdaut, um vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) aus dem Gewebeverband zu vereinzeln. Zur Vermeidung einer Kontamination der Kultur wurden alle Schritte unter der Sterilbank ausgeführt. Hierbei wurden die Aortenstücke zunächst für 40-50 Minuten in Enzymlösung A bei 37°C vorverdaut, anschließend bei 300 x g zwei Minuten zentrifugiert und in Enzymlösung B (ebenfalls 37°C) überführt. Der Verdau wurde bei diesem Schritt durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren unterstützt. Nachdem ein Auflösen der extrazellulären Matrix, nach circa 12-25 Minuten, deutlich zu erkennen war, wurde das Gemisch in 10 ml Medium (DMEM Gluta max mit 4.5 g/l D-Glucose und Pyruvat, versetzt mit 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS) überführt, um die Enzymtätigkeit abzustoppen und eine Lyse der Zellmembran zu vermeiden. Zur Gewinnung der VSMC wurde 7 Minuten bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität versetzte man 18 µl Zellsuspension mit 2 µl Trypanblaulösung. Beim Auszählen dieser Suspension in der Neubauerkammer stellten sich tote Zellen als dunkelblau dar. Die Ausbeute pro Aorta lag zwischen 100000 und 300000 Zellen, bei einer Vitalität von mindestens 96%. Die Kultur erfolgte bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank. Ein erster Mediumswechsel erfolgte nach drei Tagen, alle weiteren im zweitägigen Abstand. Nach 7-10 Tagen stellte sich ein subkonfluent Zellerasen ein.

Ca²⁺-freier Puffer	Inhaltsstoff	Menge	Enzymlösung A	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.4 autoklaviert	Na Glutamat	85 mM	pH 7.4 sterilfiltriert	BSA	1 mg/ml
	NaCl	60 mM		DTT	1 mg/ml
	Hepes	10 mM		Papain	0.7 mg/ml
	KCl	5.6 mM		Ca ²⁺ -freier Puffer	
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM			
	Aqua bidest		Enzymlösung B	Inhaltsstoff	Menge
			pH 7.4 sterilfiltriert	BSA	1 mg/ml
				Hyaluronidase	1 mg/ml
				Kollagenase	1 mg/ml
				Ca ²⁺ -freier Puffer	

2.4 Immunfluoreszenz

Bei der in dieser Arbeit verwandten Methode handelt es sich um eine indirekte Immunfluoreszenzmethode. Hierbei bindet ein primärer Antikörper, von definierter Herkunft, an antigene Strukturen innerhalb der Zelle. Dieser kann durch einen zweiten AK detektiert werden, welcher Spezies spezifisch den F_c-Teil des primären AK bindet. Dieser sekundäre AK kann durch ein konjugiertes Fluorophor detektiert werden.

Die unter 2.3.2 gewonnenen VSMC wurden mit einer Dichte von 10000 Zellen/Kammer auf Glasobjektträgern von BD Falcon mit einem Acht Kammeraufsatz ausgesät. Durch diesen Kammeraufsatz aus Polystyrol konnten die einzelnen Zellpopulationen mit unterschiedlichen Reagenzien und Antikörpern, bei ansonsten gleichen Bedingungen behandelt werden. 24-48 Stunden vor der Färbung wurden die Zellen in Serum freies Medium überführt. Durch den Wegfall der im Serum enthaltenen Cytokine und Wachstumsfaktoren, sollte das Wachstum der Zellen arretiert werden und die Zellen wieder in einen differenzierten und einheitlichen Phänotyp überführt werden. Zum Erhalt des Status Quo wurden die Zellen für 15 Minuten in einer 4°C kalten Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Aufgrund seiner Eigenschaft Proteine untereinander quervernetzen, bleiben die Strukturen der noch lebenden Zellen erhalten. Eine Lösung von 2% PFA in PBS erwies sich für die VSMC als guter Kompromiss aus ausreichender Fixierung und zufriedenstellender Auflösung beim Mikroskopieren. Zwischen allen weiteren Schritten erfolgte ein jeweils dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten. Zur Permeabilisierung und zum Freilegen der Antigene wurden die Zellen für 10 Minuten in einer Lösung aus 0,2% Triton-X 100 in PBS inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation in 10% BSA geblockt. Der primäre AK wurde in PBS mit 10% BSA suspendiert und konnte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler binden. Der sekundäre AK wurde in PBS mit 1% BSA suspendiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden ebenfalls auf dem Schüttler. Um ein Ausbleichen des Fluorophors zu vermeiden, wurde ab diesem Schritt weitestgehend im Dunklen gearbeitet. Zum

Abschluss wurden die gefärbten Zellen durch Aufbringen eines Deckglases (24x50x0.13mm, VWR) mit fluoreszenzfreiem Glycergel Mounting Medium konserviert. Die Objektträger wurden bei 4°C im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

2.4.1 Mitochondrienfärbung

Zur Färbung der Mitochondrien wurde der MitoTracker kit Deep Red FM der Firma Invitrogen benutzt. Dieser arbeitet auf Basis eines Carbocyanin-Farbstoffes, der aufgrund seiner Lipophilie gut ins Cytosol gelangt. Dort wird er von aktiven Mitochondrien aufgenommen und akkumuliert, was eine Färbung an lebenden Zellen erfordert. Hierzu wurden die Zellen 45 Minuten vor der Fixierung mit PFA mit einer 500 nM Lösung des Farbstoffs in serumfreiem Medium überschichtet. Die Beladung erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und gefärbt wie unter 2.4 beschrieben. Die Anregung des MitoTrackers lag bei 644 nm, die Emission bei 665 nm.

2.5 Proteinanalyse

2.5.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde eine photometrische Methode verwandt (Lowry et al. 1951), in der Modifikation nach Peterson (Peterson 1977). Hierbei wurden je zweimal 5 µl der unter 2.3.1 gewonnenen Gewebelysate zuerst mit 0,15% Deoxycholatlösung und 72% Trichloressigsäure gefällt, wodurch sich die Störanfälligkeit der Methode deutlich verbesserte. Die Bestimmung erfolgte mit dem Sigma Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification gemäß den Angaben des Herstellers. Die ausgefällten Proteine wurden in Lowrys Reagenz aufgenommen. Dieses enthält zweiwertige Kupferionen, welche in alkalischer Lösung mit den Peptidbindungen der Proteine in einer Biuret Reaktion einen blau-violetten Komplex ergeben. Nach 20 Minuten Inkubation wurde Follin Ciocalteu's Phenol Reagenz zugegeben. Dieses enthält Molybdän-VI und Wolfram-VI Heteropolysäuren. Nach einer Reduktion durch das nunmehr einwertige Kupfer ergab sich nach einer 30 minütigen Inkubation das tiefblaue Molybdänblau, welches bei 500-800 nm absorbiert. Dieses Gemisch wurde im UV Meter (Biophotometer Eppendorf) vermessen. Um der gemessenen Absorption eine Proteinmenge zuordnen zu können, wurden Standards bekannter Proteinkonzentration in exakt gleicher Weise mitbestimmt. Diese enthielten in je zweifacher Ausführung 0, 12.5, 50, 100 und 200 µg/ml BSA.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Hierzu lässt man die Proteine senkrechte, in einem elektrischen Feld über ein Polyacrylamidgel laufen. Je nach Menge des verwendeten Acrylamids (AA) und dessen Vernetzung mit Bis-Acrylamid (BA) lässt sich ein enger- oder gröbermaschiges dreidimensionales Gefüge erstellen, in welchem Proteine mit geringerem Molekulargewicht schneller zur Anode wandern als Proteine mit größerem. Das Molekulargewicht der in dieser Arbeit untersuchten Proteine lag zwischen 38 und 240 kDa. Die beste Trennung ergab sich bei einer AA-Konzentration von 11,5%. Die Gele wurden mit Mini Protean Tetracell der Firma Biorad gegossen und getrennt. Das noch flüssige Trenngel wurde bis zwei Zentimeter unter den Rand der Glasplatten eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 Stunde war das Gel auspolymerisiert und der Isopropanol wurde entfernt. Der verbliebene Spalt wurde mit Sammelgel (5% AA) aufgefüllt und mit einem Kamm versehen, so dass sich pro Gel 10 Taschen zur Beladung ergaben. Die fertigen Gele wurden in die Trennkammer überführt, die Taschen mit Laufpuffer gespült, und die Kammer mit selbigem befüllt. Pro Tasche wurden 18 µl Probe aufgetragen, die Proben wurden zuvor mit Lysepuffer so verdünnt, dass dies 50 µg Protein entsprach. Um Einflüsse der Tertiär- und Quartärstruktur auf die Mobilität der Proteine zu eliminieren, wurden die Proben vor dem Auftrag mit Laemmli Puffer versetzt und für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur Identifikation der Proteingröße im fertigen Gel wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (Fermentas Page Ruler™, Prestained Protein Ladder) mit aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 150 V für circa 90 Minuten.

Trenngel 11.5%	Inhaltsstoff	Menge	Sammelgel 5%	Inhaltsstoff	Menge
Ansatz für 2 Gele	AA 30% BA 0.2%	6.5 ml	Ansatz für 2 Gele	AA 30% BA 0.2%	0.83 ml
	1.8 M Tris pH 8.8	3.6 ml		0.6 M Tris pH 6.8	0.5 ml
	Aqua bidest	6.5 ml		Aqua bidest	3.6 ml
	10% SDS	167 µl		10% SDS	50 µl
	TEMED	20 µl		TEMED	10 µl
	10% APS	200 µl		10% APS	50 µl
4x LaemmliPuffer	Inhaltsstoff	Menge	Laufpuffer	Inhaltsstoff	Menge
	Tris pH 6.8	240 mM		Tris pH 8.3	25 mM
	DTT	200 mM		Glycin	192 mM
	SDS	8% (w/v)		SDS	1% (w/v)
	Glycerol	40% (w/v)		Aqua bidest	
	Bromphenolblau	0.004%			
	Aqua bidest				

2.5.3 Western Blot

Um die Proteine immunologisch detektieren zu können, wurden diese waagrecht in einem elektrischen Feld auf eine Poly-Vinyliden-Di-Fluorid Membran (PVDF, Millipore) geblottet. Dieser Proteintransfer wurde im semidry Verfahren auf einem Elektrobloetter der Firma VWR ausgeführt. Dieser Blotter besteht aus zwei Graphitplatten, an welchen Strom angelegt werden kann. Errichtet man auf der Anodenplatte folgenden Aufbau aus Whatmanfiltern (GB001 Gel Blotting Papier, Schleicher & Schüll), Gel und Membran:

- 3 Lagen Filterpapier getränkt in Anodenpuffer 1
- 2 Lagen Filterpapier getränkt in Anodenpuffer 2
- PVDF-Membran in Methanol aktiviert
- SDS-Gel
- 5 Lagen Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer
- Kathodenplatte

so werden die Proteine auf ihrem Weg zur Anode durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran fixiert. Da Luftblasen innerhalb des Aufbaus den Übertrag behindern, wurden diese durch wiederholtes Ausstreichen entfernt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA/Gel ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) für 1 Stunde.

Anodenpuffer 1	Inhaltsstoff	Menge	Anodenpuffer 2	Inhaltsstoff	Menge
pH 10.4	Tris	36.3 g	pH 10.4	Tris	3.6 g
	Methanol	200 ml		Methanol	200 ml
	Aqua bidest	ad 1 l		Aqua bidest	ad 1 l
Kathodenpuffer	Inhaltstoff	Menge	TBST	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.6	Tris	3 g	pH 8.0	Tris	1.21 g
	E-Aminocaprinsäure	5.8 g		NaCl	8.23 g
	Methanol	200 ml		Tween 20	500 µl
	Aqua bidest	ad 1 l		Aqua bidest	ad 1 l

2.5.4 Detektion

Durch die Fixierung an der Membran waren die Proteine für die weitere Detektion durch Antikörper leichter zugänglich. Zudem wurde durch die Verwendung von Methanol SDS aus seiner Bindung verdrängt, wodurch zusätzlich die sterische Hinderung der AK-Bindung wegfiel. Ein weiterer Vorteil des Entfernens von SDS bestand in einer verstärkten hydrophoben Wechselwirkung zwischen Membran und Proteinen, welche hierdurch zum Teil auch ihre tertiäre Struktur wiedererlangen.

2.5.4.1 Zwischenfärbung

Um den korrekten Transfer der Proteine zu überprüfen, erfolgte eine Zwischenfärbung der Membran mit Ponceau S. Hierbei handelt es sich um einen roten Azofarbstoff, der reversibel an Aminogruppen bindet.

Dazu wurden die Membranen nach dem Blotten in TBST gewaschen und 1 Minute in 0,2% Ponceau S Lösung (0.2 % Ponceau S in TBST) geschwenkt. Proteinbanden waren dann als rote Striche zu erkennen. Aufgrund seiner Wasserlöslichkeit konnte Ponceau S wieder ausgewaschen werden.

2.5.4.2 Photochemische Detektion

Die Membranen wurden im Anschluss an die Zwischenfärbung 5 Minuten in 5% Magermilchpulver in TBST gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde mit demselben Puffer über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 3 x 5 Minuten mit TBST gewaschen, bevor für zwei Stunden auf dem Überkopfschüttler mit primärem Antikörper inkubiert wurde. Hierzu wurden die Membranen in 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, welche eine Suspension aus Antikörper und 3% BSA, 0,05% NaN_3 in TBST enthielten. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde 3 x 5 Minuten in 1% Milchpulver/TBST gewaschen, bevor eine einstündige Inkubation in sekundärem Antikörper (in 1% Milchpulver/TBST) erfolgte. Hierauf wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden über eine Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen. Hierzu wurden H_2O_2 und Luminol (Thermo scientific, Rockford, USA) zu gleichen Teilen vermischt und die Membranen für 2-3 Minuten inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase oxidierte dabei das Luminol. Die auftretende Chemolumineszenz wurde auf Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) gebannt. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einer Entwicklermaschine (Cawomat 2000, Cavo).

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Konfokal Mikroskopie

Die Betrachtung, speziell bei den Versuchen zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation und der Koloalisation, erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss). Die zur Anregung der jeweiligen Fluorophore benutzten Wellenlängen wurden durch unterschiedliche Laser erzeugt, welche in Kombination mit den jeweiligen Bandpassfiltern eine spezifische Detektion der gekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexe erlaubten. Monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm wurde durch einen Argon Laser erzeugt, entstehende Emission von Alexa Fluor® 488, oder ähnlichen Fluorophoren,

durch einen Bandpassfilter von 505-530 nm selektiert. Zur Generierung von 543 nm diente ein 1W HeNe-Laser in Kombination mit einem BP von 560-615 nm (Alexa Fluor® 546/TRITC). Für 633 nm kam der HeNe-Laser mit 5W mit einem Langpassfilter >650 nm zum Einsatz (Alexa Fluor® 647). Das Pinhole wurde auf eine optische Schichtdicke von 1 µm festgelegt. Die Betrachtung erfolgte mit einem Plan-Neofluar Objektiv 40x/1.30 Öl. Die Betrachtung erfolgte mit der Zen Software von Zeiss.

2.6.2 Epifluoreszenz Mikroskopie

Ebenso kam ein aufrecht, inverses Fluoreszenzmikroskop zum Einsatz (Axio Observer.Z1, Zeiss). Da dieses im Gegensatz zum konfokalen Mikroskop die Fluoreszenz aus der gesamten Dicke einer Probe detektiert, wurde dieses nicht bei den Kollokalisationsstudien verwandt. Sofern nicht anders angegeben kam für alle Messungen, wegen seiner Lichtstärke, ein Fluar 40x/1.3 Öl Objektiv (Zeiss) zum Einsatz. Dieses hatte eine Auflösung von 0,26 µm.

2.6.2.1 Messstand für immunologische Detektion

Als Lichtquelle diente hier ein externer Metall-Halogenid Brenner (HXP120, Zeiss). Dieser emittiert weißes Licht und zeichnet sich durch Emissionsspitzen im UV- Blau- und Grünbereich der Anregung aus. Durch diese Emissionsspitzen ergeben sich sehr starke Fluoreszenzsignale, weswegen der HXP sich besonders gut zur allgemeinen Fluoreszenzmikroskopie eignet. Da dieser im Gegensatz zum Laser kein monochromatisches Licht erzeugt, sondern ein komplettes Spektrum abstrahlt, muss dieses durch Anregungsfilter sortiert werden. Dadurch wird die Spezifität der Fluorophoranregung gewährleistet. Um eine Detektion falschpositiver Signale zu vermeiden, kamen Bandpassfilter zum Einsatz, welche nur für das fluorophorspezifische Fluoreszenzlicht durchlässig waren. Mittels dichroischer Spiegel wurden das Anregungslicht zur Probe und das emittierte Fluoreszenzlicht auf das Okular umgelenkt. In Tabelle 7 ist eine Übersicht der verwendeten Filterkombinationen, sowie deren Einsatzgebiet dargestellt. Als Detektor diente eine Peltier gekühlte CCD Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) mit 1.4 Mega Pixel. Als Software wurde AxioVision (Zeiss) benutzt.

Bezeichnung	Excitation (nm)	Strahlenteiler (nm)	Emission (nm)	Verwendung
Fura 2	nicht benötigt	409	465-555	Calciummessungen
DAPI	365	395	420-470	Kernfärbungen
eGFP	450-490	495	500-570	Cy2, Alexa Fluor® 488
DS red	537,5-562,5	570	570-640	TRITC, Cy3, Alexa Fluor® 546 Membranpotential
Cy5	625-655	660	665-715	Cy5, Alexa Fluor® 647

Tabelle 7: Liste der verwendeten Filterwürfel

2.6.2.2 T.I.L.L System

Für die kinetischen Versuche kam ein alternatives System von T.I.L.L Photonics zum Einsatz. Dieses zeichnet sich durch seine hohe Messgeschwindigkeit aus. Als Lichtquelle diente hier ein Polychrome IV Monochromator mit einer 150 Watt Xenon Lampe. Diese strahlt ebenso wie der HXP weißes Licht ab, jedoch in einem homogeneren Spektrum, weswegen mit dieser Lampe hervorragend Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlicher Anregung verglichen werden können. Durch den Wegfall der Emissionsspitzen eignet sich diese Lampenart zudem gut zur Lebendzellbetrachtung, da die Phototoxizität weniger gegeben ist. Ein weiterer großer Vorteil liegt in der Emission monochromatischen Lichts und dem extrem schnellen Umschalten (maximal 3 ms) zwischen zwei Wellenlängen. Durch Auftrennen des Spektrums über ein Beugungsgitter, kann mit Hilfe eines galvanometrischen Scanners, monochromatisches Licht im Bereich von 208-763 nm Wellenlänge erzeugt werden. Dieses wird in ein Glasfaserkabel eingespeist und über einen Koppelschieber als Alternative zum HXP in den Strahlengang des Axio Observers gelenkt. Als Kamera diente hier eine Peltier gekühlte CCD Kamera mit 1.3 Mega Pixel (Imago, T.I.L.L.). Die Steuerung des Systems und die Datenverarbeitung erfolgten mit der Software TillVision 4.0.

2.7 Calciummessungen

Die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+})_i beruht auf einer ratiometrischen Fluoreszenzmethode mit Fura 2 AM (calbiochem) (Grynkiewicz et al. 1985). Fura 2 (1-{2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy}-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure gelangt als lipophiler Aceto-Methyl-Ester in die Zelle, wird durch unspezifische Esterasen gespalten und liegt als freie Säure vor, die aufgrund ihrer Polarität die Zelle nur noch langsam verlässt. Als Komplexbildner kann Fura 2 freies Calcium spezifisch im Verhältnis 1:1 chelatieren, wodurch sich sein Anregungsspektrum verschiebt. Der isosbestische Punkt liegt dabei bei 357 ± 0.5 nm, das heißt bei einer Anregung mit dieser Wellenlänge hat die Bindung von Calcium keinen Einfluss auf das Absorptionsverhalten. Bei Anregung mit kürzeren Wellenlängen wird der Chelatkomplex angeregt, bei Anregung mit längerwelligem Licht freies Fura. Die Emission ist in beiden Fällen sehr ähnlich und liegt bei 505 - 512 nm. Belichtet man die Probe in unmittelbarer Folge mit 340 nm und 380 nm, so kann man aus dem Verhältnis der Fluoreszenzemissionen bei 510 nm (ratio 340/380) relative Änderungen der (Ca^{2+})_i mitverfolgen. Durch das Bilden des Verhältnisses sind die Ergebnisse unabhängig von der Größe der Zelle und ihrer Beladung mit Farbstoff.

2.7.1 Zellkultur für Ca^{2+} -Messungen

Die unter 2.3.2 gewonnenen primären VSMC wurden auf Borosilikatglasplättchen (20x0.13 mm, Marienfeld) gezüchtet. Diese wurden vor der Überschichtung mit Zellsuspension mit Ethanol abgeflammt und in sterile 12 Loch Multischalen mit Deckel (Nunclon Surface) eingebracht. Pro Loch erfolgte eine Aussaat von 40000 bis 80000 Zellen, wodurch sich nach 7-10 Tagen in der unter 2.3.2 beschriebenen Haltung ein subkonfluenter Zellrasen ergab. 24-48 Stunden vor der Messung wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt, was die Reaktivität deutlich erhöhte.

2.7.2 Messung

Vor der Messung wurden die Zellen in Messkammern überführt, welche ein Überschichten der Zellen mit Flüssigkeit und die Montage im Mikroskop erlaubten. Bei einer Temperatur von 20-22°C wurde für eine Stunde im Dunkeln mit 500 µl einer 3 µM Fura 2 AM Lösung in Tyrode mit 1% BSA inkubiert. Im Anschluss wurde nicht aufgenommener Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit Tyrode entfernt und der Ansatz bei 28°C für 30 Minuten stengelassen, um eine vollständige Spaltung des Esters zu gewährleisten. Die Zellen wurden nicht länger als eine Stunde gemessen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des unter 2.6.2.2 beschriebenen T.I.L.L. Systems am Zeiss Axio Observer. Zunächst wurde die Fluoreszenzintensität der zu messenden Zellen überprüft, und die Belichtungszeit so gewählt, dass die Emissionsintensitäten während der Messung innerhalb des Messbereichs blieben. Hierbei wurde für beide Anregungswellenlängen die gleiche Belichtungszeit gewählt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Üblicherweise lagen diese Werte bei 3 – 10 ms. Die Anregung mit 340 und 380 nm erfolgte pro Sekunde einmal. Zur Applikation von Substanzen standen zum einen eine Schlauchpumpe (reglo digital, Ismatec) zur Verfügung, mit welcher Substanzen ins Bad eingewaschen werden konnten. Zum anderen bestand die Möglichkeit, Zellen direkt mit einer Glaskapillare zu stimulieren. Diese war über einen Schlauch mit einem Hormon Reservoir verbunden und konnte mit Hilfe eines Mikromanipulators (Zeiss) direkt an den Zellen positioniert werden. Zwischen Kapillare und erhöhtem Reservoir, befand sich ein Magnetschalter (The Lee Co.) im Schlauch. Über die Öffnungsdauer desselben konnte die zu applizierende Hormonmenge geregelt werden. Ferner bestand die Möglichkeit, Substanzen direkt ins Bad zu applizieren. Durch die Position der Absaugung war gewährleistet, dass sich ein konstantes Volumen von 500 µl im Bad befand, wodurch eine genaue Dosierung möglich war.

Tyrode	Inhaltsstoff	Menge	10xGlucose	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.4	NaCl	140 mM	pH 7.4	Glucose	100 mM
Glucose erst bei Bedarf zugesetzt	Hepes	5 mM		Aqua bidest	
	KCl	5 mM			
	CaCl ₂ x2H ₂ O	2 mM			
	MgSO ₄	1.2 mM			
	Glucose	10mM			
	Aqua bidest	ad 90%			

K85-Tyrode	Inhaltsstoff	Menge	Ca²⁺-freie-Tyrode	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.4	NaCl	57 mM	pH 7.4	NaCl	140 mM
Glucose erst bei Bedarf zugesetzt	Hepes	5 mM	Glucose erst bei Bedarf zugesetzt	Hepes	5 mM
	KCl	85 mM		KCl	5 mM
	CaCl ₂ x2H ₂ O	2 mM		MgCl ₂ x6H ₂ O	2 mM
	MgSO ₄	1.2 mM		MgSO ₄	1.2 mM
	Glucose	10mM		EGTA	50 µM
	Aqua bidest	ad 90%		Glucose	10mM
				Aqua bidest	ad 90%

NMDG-Tyrode	Inhaltsstoff	Menge	Ca²⁺-freie-NMDG-Tyrode	Inhaltsstoff	Menge
pH 7.4	NMDG	140 mM	pH 7.4	NMDG	140 mM
Glucose erst bei Bedarf zugesetzt	Hepes	5 mM	Glucose erst bei Bedarf zugesetzt	Hepes	5 mM
	KCl	5 mM		KCl	5 mM
	CaCl ₂ x2H ₂ O	2 mM		MgCl ₂ x6H ₂ O	2 mM
	MgSO ₄	1.2 mM		MgSO ₄	1.2 mM
	Glucose	10mM		EGTA	50 µM
	Aqua bidest	ad 90%		Glucose	10mM
				Aqua bidest	ad 90%

2.8 Membranpotentialmessungen

Die Messung des Membranpotentials wurde mit dem FLIPR Membrane Potential assay kit (Molecular Devices) durchgeführt. Der im Kit enthaltene Fluoreszenzfarbstoff bindet dabei an Kationen und folgt diesen auf ihrem Weg durch die Membran. Somit sind ein Einstrom positiver Ladung und die daraus resultierende Depolarisation mit einer Zunahme der intrazellulären Fluoreszenz verbunden. Bei einer Hyperpolarisation nimmt die Fluoreszenz infolge des Ausstroms positiver Ladungsträger wieder ab. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses sind im Kit Fluoreszenzabschwächer enthalten, so dass außerhalb der Zelle angeregter Farbstoff schwächer fluoresziert, woraus ein geringes Hintergrundsignal resultiert.

2.8.1 Vorbereitungen

Die Messungen wurden mit dem unter 2.6.2.2 beschriebenen System von T.I.L.L Photonics durchgeführt. Alle Substanzen wurden mit der Pumpe ins Bad eingewaschen. Die VSMC wurden wie unter 2.7.1 kultiviert. Da die Messungen von der intrazellulären

Farbstoffkonzentration abhängig sind, bedarf die Methodik großer Sorgfältigkeit. So verursachen bereits kleine Schwankungen in der Flussgeschwindigkeit, und damit der pro Zeit angespülten Farbstoffmoleküle, Unterschiede im emittierten Signal. Um dem zu entgehen, wurden alle Zellen während der gesamten Messung mit einer konstanten Fließrate von exakt 0,36 ml/Minute umspült. Um Substanzen schneller in der gewünschten Konzentration ins Bad zu bekommen, wurde die Absaugung so eingestellt, dass sich ein Volumen von 300 µl in den Messkammern befand, was einen schnelleren Austausch des Badvolumens bedingte. Da die Substanzen über die Pumpe ins Bad eingewaschen wurden und kleinste Unterschiede in der Farbstoffkonzentration der eingespülten Lösungen ebenso falsche Signale verursachten, wurde zunächst ein großer Ansatz aus Tyrode und Farbstoff hergestellt. Hierzu wurde die Stammlösung (1 mg Pulver auf 1 ml milipore Wasser), mit Tyrode in definierter Weise vorverdünnt. Aus diesem Ansatz wurden dann die unterschiedlichen wirkstoffhaltigen Lösungen hergestellt. Dabei war in der Vorverdünnung die Volumenzunahme durch die Wirkstoffgabe mit berücksichtigt, so dass am Ende eine Farbstoffkonzentration von 5 µg/ml vorlag. Unterschiede im applizierten Volumen wurden durch die Gabe von Tyrode ausgeglichen.

2.8.2 Messung

Die Zellen wurden in die unter 2.7.2 beschriebenen Messkammern überführt und mit 300 µl Tyrode mit 5 µg/ml Farbstoff überschichtet und ins Mikroskop eingespannt. Zur Fluoreszenzanregung wurden 550 nm eingestellt, und bei 570-640 nm detektiert. Die Belichtungszeit lag bei allen Messungen bei 3 ms. Die Beladung der Zellen wurde am Mikroskop mitverfolgt, wobei alle 10 Sekunden belichtet wurde. Nach circa 10 Minuten war das Signal konstant und die Messung wurde begonnen. Während der Messung wurde alle 2.5 Sekunden belichtet.

2.9 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mithilfe des Students t-Tests bestimmt. Bei direktem Vergleich von mehr als zwei Gruppen kam die Anova one way Varianz Analyse mit Korrektur nach Bonferroni zum Einsatz. Dabei wurde statistische Signifikanz als gegeben angenommen, wenn ein p-Wert von < 0.05 erreicht wurde. Als hochsignifikant wurde ein p-Wert < 0.01 definiert, höchst signifikant < 0.001 . Entsprechend wurden diese Signifikanzniveaus in den Graphen durch 1, 2 oder 3 Sterne (*) dargestellt. Nicht signifikant Ergebnisse mit einem p-Wert > 0.05 wurden mit n.s. markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Proteinen

Im folgenden Teil wurden die Expressionslevel verschiedener Proteine in unterschiedlichen glattmuskulären Organen der IRAG KO Maus im Vergleich zu WT Mäusen untersucht. Aus früheren Arbeiten an IRAG $\Delta 12$ Mäusen ist bereits eine Herabregulation von cGK1 β bekannt, bei gleichzeitiger Hochregulation von cGK1 α (Geiselhoring, Werner et al. 2004b). Da IRAG im WT zudem im Komplex mit IP₃R1 vorliegt, lag es nahe, den Effekt des Fehlens von IRAG auf das Expressionslevel von IP₃R1 zu untersuchen. Ein besonderes Interesse in dieser Arbeit lag somit auf der Expression der Splice Varianten der cGK1, sowie der Isoformen der IP₃-Rezeptoren in den glattmuskulären Geweben von Aorta, Blase und Uterus, sowie Magen, Jejunum und Colon. Als Ladungskontrolle wurde jeweils β -Aktin mitbestimmt. Alle Versuche wurden mindestens zweimal ausgeführt mit Geweben aus mindestens zwei verschiedenen Geschwisterpaaren. In Abbildung 4 ist zunächst für ausgewählte Proben das Fehlen von IRAG in den KO Tieren bestätigt.

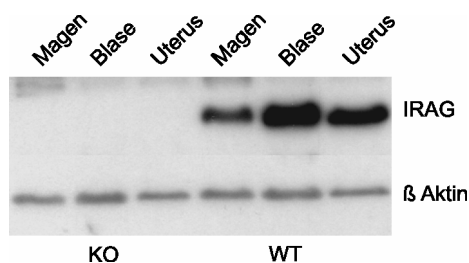


Abbildung 4: Expression von IRAG.

IRAG ist auf Proteinebene in den Geweben von KO Tieren nicht mehr zu detektieren

3.1.2 Expression der IP₃-Rezeptoren

Betrachtet man in Abbildung 5 das Ausmaß der IP₃R1 Expression, so ist kein Unterschied zwischen den Geweben der IRAG KO Tiere im Vergleich zu den WT feststellbar. Auffällig ist dabei, dass im Jejunum weder im KO noch im WT IP₃R1 nachgewiesen werden konnte. IP₃R2 ist ebenso in allen Geweben außer Jejunum nachweisbar. Unterschiede im Expressionsverhalten ergaben sich nur für den Magen. Hier führt das Fehlen von IRAG zu einer Hochregulation von IP₃R2. IP₃R3 ist im WT in allen Geweben einschließlich Jejunum nachweisbar, wenngleich hier nur schwach. Im Gegensatz dazu fehlt im Jejunum der KO Tiere auch IP₃R3. Ansonsten war die Expression nicht verändert.

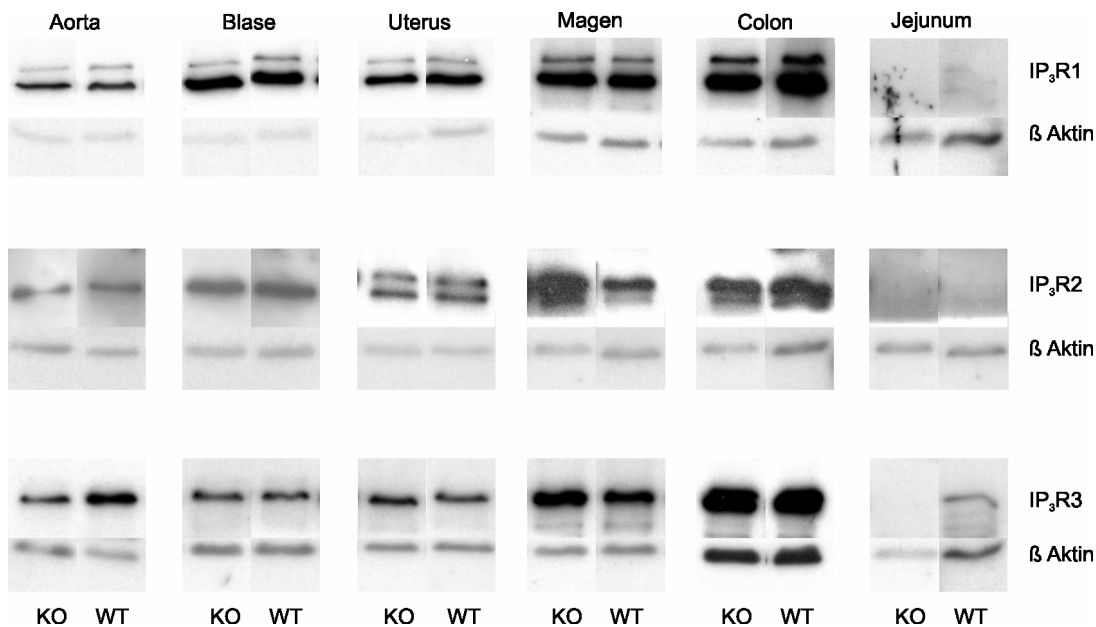


Abbildung 5: Expressionsvergleich der IP₃R Subtypen

IP₃-Rezeptoren sind im KO in den meisten Geweben ähnlich stark exprimiert wie im WT. Lediglich im Jejunum konnte kein IP₃-Rezeptor 3 detektiert werden. Im Magen führt das Fehlen von IRAG zu einer kompensatorischen Hochregulation von IP₃R2.

3.1.3 Expression der cG-Kinasen

Detektiert wurden hierbei cGK1α und cGK1β mit einem Molekulargewicht von 76 – 78 kDa. Diese unterscheiden sich im N-terminalen Bereich und können somit selektiv durch spezifische Antikörper detektiert werden. Zudem wurde ein weiterer primärer Antikörper verwandt, der die gemeinsame Domäne bindet und somit beide Varianten erkennt (cGK1c). Im Vergleich zu den WT Tieren ist eine Reduktion der Expression von cGK1β in allen Geweben der IRAG KO Tiere zu beobachten. Die Expression von cGK1α hingegen ist unverändert (Abbildung 6). Eine Ausnahme bildet hierbei der Magen, bei dem das Fehlen von IRAG zu einer Hochregulation von cGK1α führt. Dieser Effekt bestätigt sich bei Betrachtung des gesamten Gehalts an cGK1. Hier ist in allen Geweben eine verminderte cGK1 Expression zu beobachten, mit Ausnahme des Magens, bei dem die Hochregulation der cGK1α die Herabregulation von cGK1β zu kompensieren scheint.

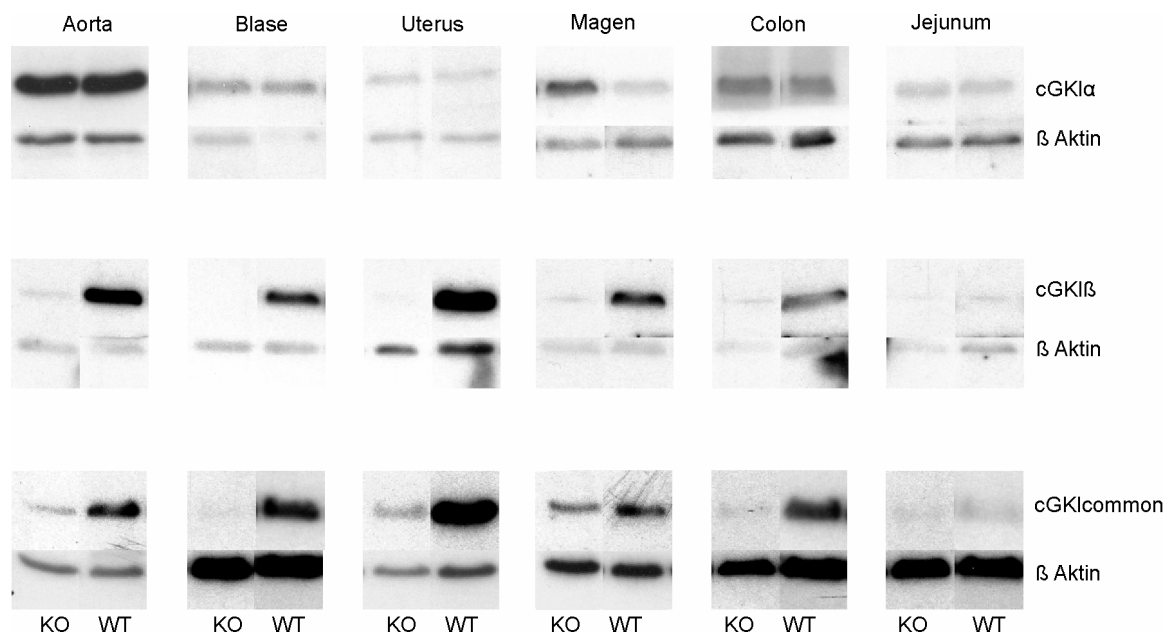


Abbildung 6: Expression der cG-Kinasen

Für Magengewebe konnte eine leichte Hochregulation der cGK1 α im KO festgestellt werden. cGK1 β dagegen ist in allen KO Geweben weniger exprimiert. Der Gesamtgehalt an cGK1 ist in allen Geweben, mit Ausnahme des Magens, erniedrigt.

3.2 Immunfluoreszenz

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Immunfluoreszenzmessungen wurden an primären glatten Muskelzellen der Aorta durchgeführt. Die Gewinnung und Kultur ist unter 2.3.2 beschrieben.

Da die primären Zellen aus dem enzymatischen Verdau eines nativen Organs gewonnen wurden, ist eine Verunreinigung der Kultur nicht auszuschließen. Obgleich die Bedingungen des Verdau und der Kultur auf VSMC ausgelegt sind, kann es dennoch zu einem Einschleppen von Endothelzellen oder Myofibroblasten kommen. Um dies zu überprüfen, wurde stichprobenartig die Reinheit mit dem glattemuskelspezifischen Marker α -Aktin geprüft. Der besseren Übersicht wegen wurde hier am Fluoreszenzmikroskop in 200 facher Vergrößerung mit einem EC Plan Neofluar 20x/0.5 gearbeitet. Zellkerne wurden mit dem interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Als Negativkontrolle dienten Myofibroblasten (nicht dargestellt). In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer solchen Kontrolle dargestellt. Rechts ist eine Kultur aus WT VSMC zu sehen, links KO VSMC. α -Aktinfilamente wurden hierbei rot, DAPI blau dargestellt. Dabei war jede mit DAPI detektierte Zelle α -Aktin positiv. Die Reinheit der Kulturen lag bei > 99%.

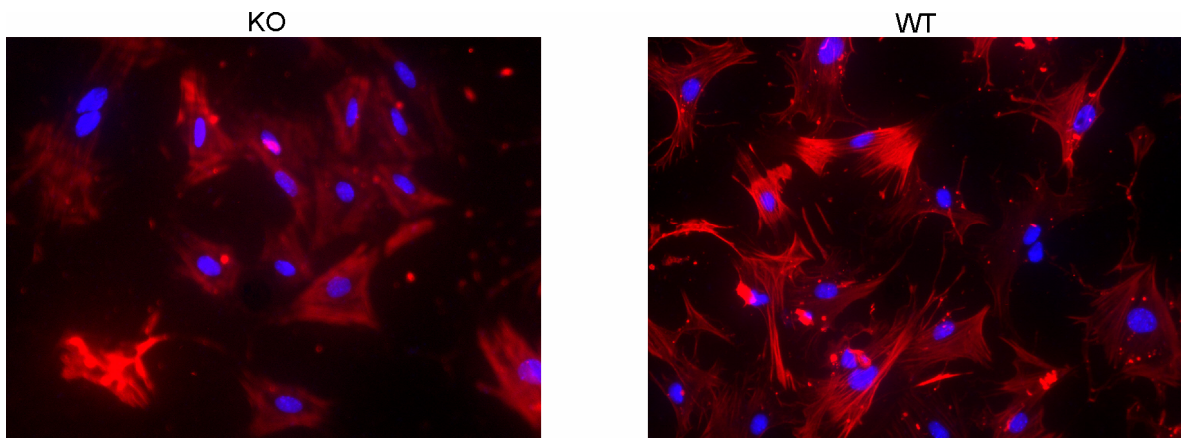


Abbildung 7: Reinheit der Primärkultur

VSMC in 200 facher Vergrößerung, aufgenommen am Epifluoreszenz Mikroskop: α -Aktin ist rot dargestellt, mit DAPI gefärbte Zellkerne blau. Links ist eine VSMC Kultur aus KO- rechts aus WT-Tieren zu sehen. Alle im Ausschnitt detektierten Zellen sind α -Aktin positiv und somit glatte Muskelzellen.

3.2.1 Überprüfung der Deletion von IRAG

Zur Überprüfung der Spezifität des primären Antikörpers und Darstellung der subzellulären Lokalisation des IRAG Proteins wurden KO und WT VSMC simultan auf IRAG und α -Aktin gefärbt. In Abbildung 8 ist das Ergebnis einer solchen Färbung gezeigt. Aktinfilamente wurden hierbei wieder rot dargestellt, IRAG grün. Dabei ist in 400 facher Vergrößerung zu erkennen, dass in den KO VSMC mit dem IRAG-AK nur mehr eine schwache Hintergrundfärbung zu erkennen ist. In der rechten Spalte stellt sich die Lokalisation von IRAG in den WT VSMC dar. Zu sehen ist eine relativ diffuse, flächige Färbung über weite Teile des Cytosols. Eine Kolo­kalisation mit den α -Aktinfilamenten war nicht gegeben. Die Verteilung ist in Analogie zu Färbungen an transfizierten Cos-Zellen (Geiselhoring, Gaisa et al. 2004a), konnte aber in dieser Arbeit zum ersten Mal für native Zellen gezeigt werden. Eine genauere Analyse der subzellulären Lokalisation ist im folgenden Kapitel dargestellt.

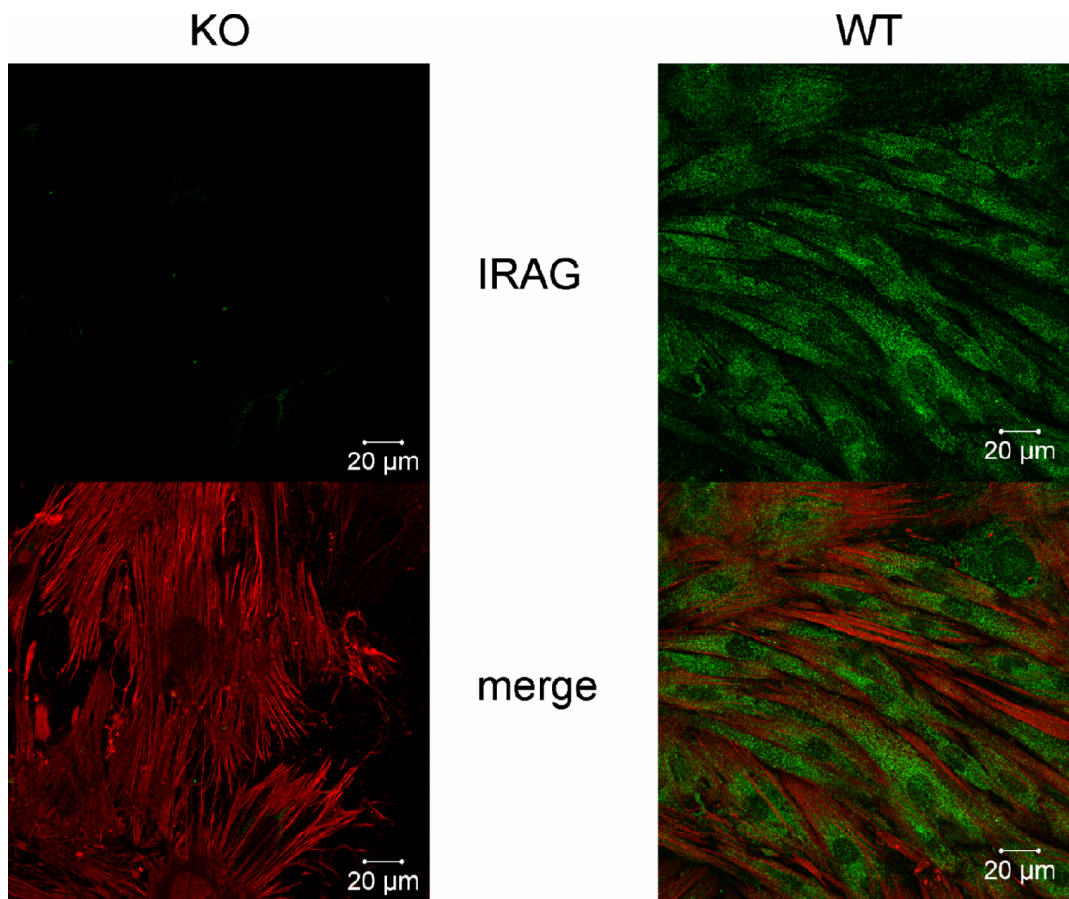


Abbildung 8: Abwesenheit von IRAG in den VSMC

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt VSMC in 400 facher Vergrößerung. Dabei ist in der oberen Reihe IRAG (grün), in der unteren Reihe IRAG zusammen mit α -Aktin (rot) gezeigt. In der linken Spalte sind KO VSMC dargestellt, in denen eine IRAG Färbung praktisch nicht mehr vorhanden war. Rechts sind WT VSMC mit IRAG zu sehen.

3.2.2 Kolokalisation von IRAG mit cGK1 und IP₃R1

Zur Darstellung des trimeren Komplexes in den VSMC von WT-Tieren wurden die Zellen simultan auf 3 verschiedene Antigene hin konfokal mikroskopisch untersucht. So wurde sowohl die Kolokalisation von IRAG mit den Splicevarianten der cGK1 betrachtet, wie auch die Kolokalisation mit IP₃R1. Eine gleichzeitige Darstellung von IP₃R1 mit den cGK Varianten war leider aufgrund des limitierten Angebots an primären Antikörpern nicht möglich, da alle zur Verfügung stehenden in Kaninchen generiert wurden. Eine differenzierende Darstellung durch sekundäre Antikörper war dadurch nicht möglich. IRAG wurde im Folgenden stets grün dargestellt, die Interaktionspartner jeweils rot. Liegen die Proteine dabei näher zusammen als 260 nm, also der maximalen Auflösung des verwendeten Objektivs, erscheinen sie bei der Detektion als ein Pixel, das sich aufgrund der Mischung von rot und grün als gelb darstellt. Als glattemuskelspezifischer Marker wurde jeweils α -Aktin mitgefärbt und hellblau dargestellt. Da α -Aktin zudem über die gesamte Zelle verteilt vorliegt, diente es zugleich als Indikator für die Morphologie der Zelle.

In Abbildung 9 ist das Ergebnis der Färbung von IRAG gemeinsam mit IP₃R1 dargestellt. Dabei sind beide Proteine flächig in retikulären Strukturen über das gesamte Cytosol verteilt, wobei eine eindeutig höhere Konzentration in den kernnahen Bereichen zu beobachten ist. Beide Proteine zeigen ein sehr hohes Maß an Kolo­kalisation, liegen aber besonders in den Randbereichen der Zelle auch zum Teil getrennt vor. Auffällig ist zudem die Lokalisation von IP₃R1 innerhalb des Zellkerns, wo er in als Punkte erkennbaren Clustern vorliegt. In diesen intranukleären Zonen liegt IP₃R1 ohne IRAG vor. Eine Kernfärbung von IRAG ist nur sehr schwach gegeben. Eine Aussage über eine Kernlokalisation ist hier nur bedingt möglich. Da die Zellen nur 4 – 5 µm dick sind, ergibt sich für die Zellkerne eine Höhe von circa 2 – 3 µm. Bei einer optischen Schichtdicke von 1 µm ist somit eine teilweise Detektion der Kernmembran nicht gänzlich auszuschließen.

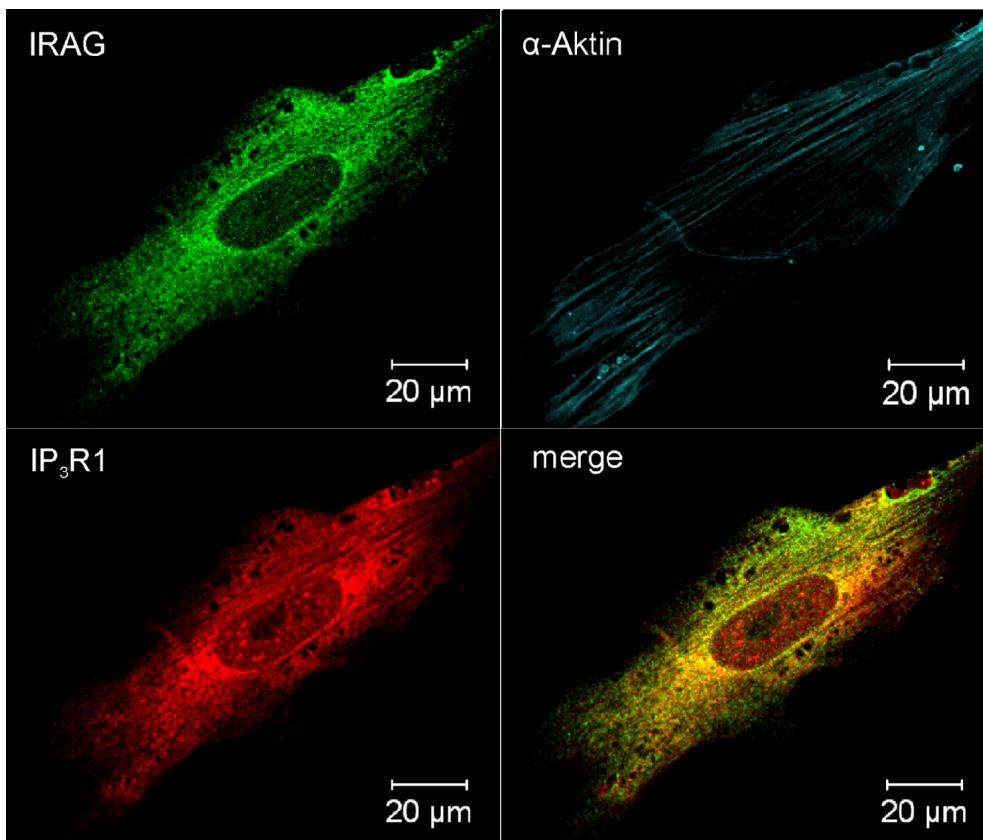


Abbildung 9: Kolokalisation von IP₃R1 mit IRAG

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt die Kolokalisation von IRAG mit IP₃R1. IRAG ist dabei grün dargestellt, IP₃R1 rot. Kolo­kale Pixel stellen sich dabei als gelb dar. In den meisten Kompartimenten ist eine Kolokalisation der beiden Proteine zu beobachten, speziell in kernnahen Bereichen. In hellblau sind α-Aktinfilamente dargestellt.

Sehr ähnlich stellt sich der Sachverhalt bei der cGK1 in Abbildung 10 dar. Bei Betrachtung der Färbungen mit cGK1c Antikörper ist eine flächige Färbung über das gesamte Cytosol zu sehen, mit einer Intensivierung des Signals in kernnahen Bereichen. Eine Kernfärbung der Kinase ist nur als schwaches Hintergrundsignal zu detektieren. Eine Kolokalisation mit IRAG findet sich im gesamten Cytosol, nimmt aber in Kernnähe zu. So ist aber auch eine unabhängige Expression beider Proteine in den Randbereichen der Zelle zu beobachten.

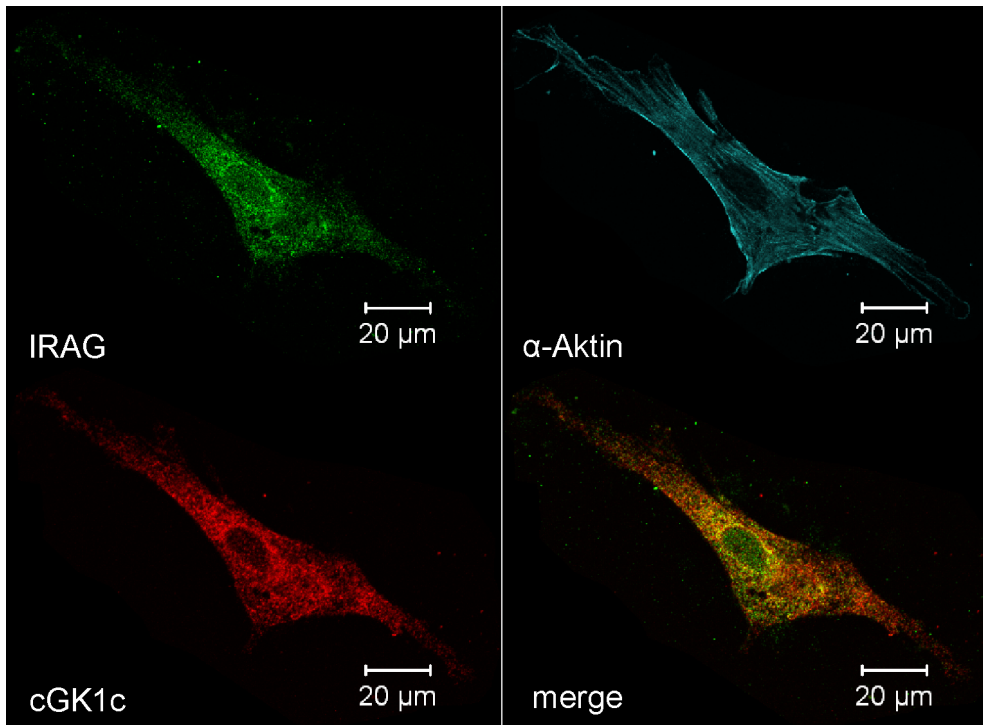


Abbildung 10: Kolokalisation von cGK1c mit IRAG

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt die Kolokalisation von cGK1 mit IRAG über weite Bereiche der Zelle, und besonders im kernnahen Bereich.

Bei der differenzierten Betrachtung der Lokalisation von cGK1 α und cGK1 β in Abbildung 11 und Abbildung 12 ist zunächst festzustellen, dass das mit dem cGK1c AK erhaltene Signal fast ausschließlich von cGK1 β herrührt, die offenbar die vorherrschende Variante in den VSMC darstellt. cGK1 β ist ähnlich wie IP₃R1 über die gesamte Zelle verteilt mit einer Zunahme in den kernnahen Bereichen, wo auch das höchste Maß an Kolokalisation mit IRAG zu beobachten ist. Auffallend ist auch, dass nur cGK1 β mit IRAG kolokal gelegen ist. Im Gegensatz dazu ist cGK1 α unsymmetrisch um den Kern herum verteilt und weist keinerlei Kolokalisation mit IRAG auf.

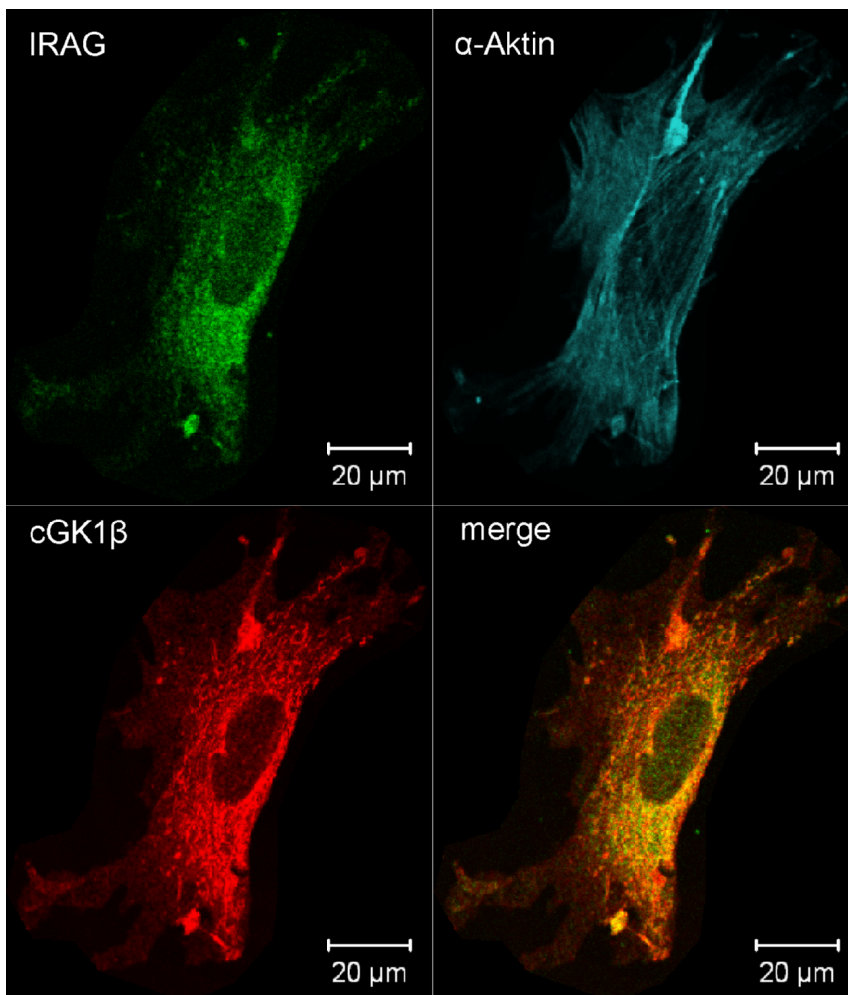


Abbildung 11: Kolokalisation von cGK1 β mit IRAG

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeugt ist die Kolokalisation von cGK1 β mit IRAG. Die beobachtete Kolokalisation tritt gehäuft im kernnahen Bereich auf.

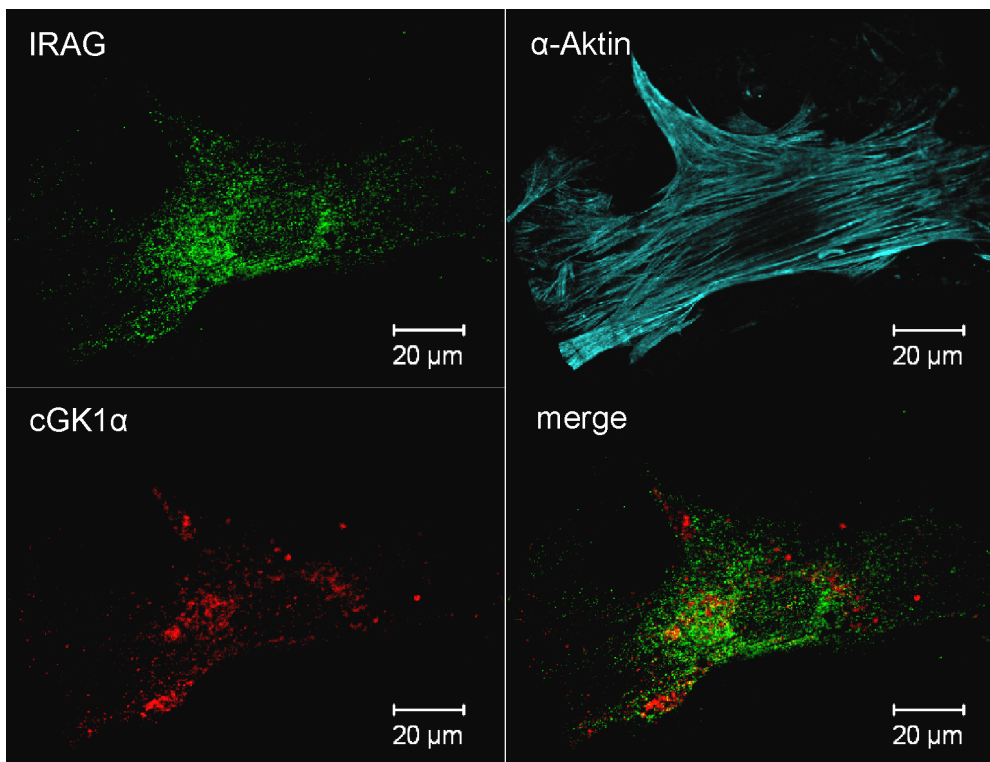


Abbildung 12: Kolokalisation von cGK1α mit IRAG

In der konfokalmikroskopischen Aufnahme ist eine klare Trennung zwischen grünem (IRAG) und rotem (cGK1α) Kanal erkennbar. Eine Kolokalisation zwischen cGK1α und IRAG ist nicht gegeben.

3.2.3 Lokalisationsstudien in KO und WT

Im folgenden Kapitel wurden die Auswirkungen der IRAG-Deletion auf die Lokalisation der Proteine des trimeren Komplexes untersucht. So wurde die relative Lage innerhalb der Zelle im Vergleich zu bekannten Markern typischer Zellorganellen dargestellt. Als Marker für das SR wurde hierbei ein Antikörper gegen eine Eingangs erwähnte Calciumpumpe (SERCA 2) gewählt (Jorgensen et al. 1988). Der Golgi Apparat wurde mittels des Oberflächenproteins Golgin 97 detektiert. Dieses ist spezifisch für die meisten Vertebraten und zeigt im Gegensatz zu vielen Golgimarkern keine Kreuzreaktion mit dem SR (Griffith et al. 1997; Kjer-Nielsen et al. 1999). Mitochondrien wurden mithilfe des MitoTracker kits detektiert. Da eine möglicherweise veränderte Lokalisation der Proteine im Ruhezustand eventuell nicht zu detektieren ist, wurde zeitgleich die Auswirkung der Aktivierung der cGMP/cGK-Signalkaskade untersucht. Hierzu wurden die Zellen eine Stunde vor ihrer Fixierung mit einer 1 mM Lösung von 8 Br-cGMP in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen (37°C und 6% CO₂) stimuliert. Die Kontrollen wurden analog behandelt mit serumfreiem Medium. Die Proteine des trimeren Komplexes sind im Folgenden immer rot dargestellt, Zellorganellen werden in grün dargestellt.

3.2.3.1 IP₃R1

Da IP₃R1 als membranständiges Protein des sarkoendoplasmatischen Retikulums beschrieben ist (Takei, Mignery et al. 1994), wurde seine Lage nur hinsichtlich des SR Markers SERCA 2 untersucht. Bei Betrachtung von Abbildung 13 sieht man in der oberen Reihe in rot IP₃R1 dargestellt. Dabei ist sowohl in den WT wie auch den KO VSMC die bereits bekannte retikuläre Verteilung im Cytosol zu erkennen mit einer Zunahme der Signalstärke im Bereich des nukleären Retikulums. Auch die Kernsprossungen sind in beiden Zelltypen deutlich zu erkennen.

Die mittlere Reihe zeigt in grün die Lokalisation von SERCA. Dabei ist ein schwaches Signal in retikulären Strukturen zu erkennen, auffällig ist jedoch die Organisation in einem ringförmigen Kranz im Cytosol. Zudem ist eine deutliche und diffuse Kernlokalisation mit löchrigen Aussparungen zu erkennen, die der äußeren Membran der Kernhülle entspricht. Bemerkenswert ist, dass IP₃R1 und SERCA im Überlagerungsbild in der unteren Reihe erstaunlich wenig Kolo-kalisation im Cytosol zeigen, obgleich beides Membranproteine des SR und wichtige Vertreter des Calciumstoffwechsels sind. So ist im Bereich der kranzförmigen Lokalisation von SERCA eine deutliche Trennung der beiden Signale zu beobachten, lediglich in wenigen Bereichen der retikulären Strukturen sind kolokale Bereiche zu erkennen. In der Kernmembran hingegen korrelieren die Signale der IP₃R1 Cluster mit den Signalen der SERCA Färbung sehr gut. Im Überlagerungsbild ist zu erkennen, dass sich beide Proteine auf denselben Strukturen der Kernmembran befinden. Bei der Stimulation mit cGMP konnte weder eine Umverteilung von IP₃R1 erkannt werden, noch änderte sich seine relative Lage innerhalb der Zelle.

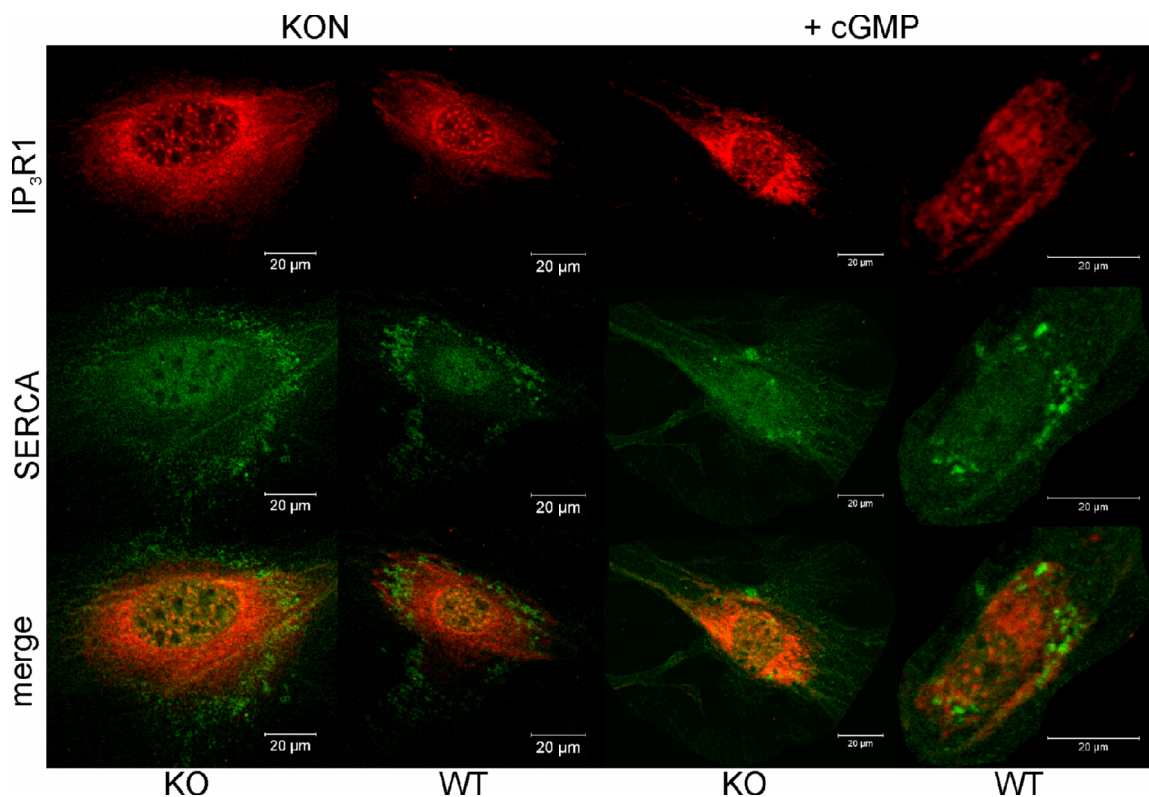


Abbildung 13: Lokalisation von IP₃R1 in WT und KO

In der konfokalmikroskopischen Aufnahme sind IP₃R1 und SERCA 2 dargestellt. Beides sind membranständige Proteine des SR. Eine Kolokalisation ist fast ausschließlich auf den Bereich der Kernlokalisation beschränkt. Unterschiede zwischen KO und WT VSMC waren nicht zu erkennen. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

3.2.3.2 cG-Kinasen

Bei der Lokalisation der cG-Kinasen sollte zum einen die typische Lage der cGK1 α und cGK1 β geklärt werden. Zum anderen wurde analysiert, wie sich die Deletion von IRAG auf die Lokalisation von cGK1 β auswirkt. Im Gegensatz zu IP₃R1 ist cGK1 β als cytosolisches Protein beschrieben und seine Lage am SR von daher über seine Bindungspartner determiniert.

3.2.3.2.1 cGK1 α

In Abbildung 14 ist in der oberen Reihe die bereits aus Abbildung 12 bekannte Position von cGK1 α dargestellt. Die mittlere Reihe veranschaulicht die Position des Golgi Apparates innerhalb der Zelle. Bei genauer Betrachtung, sind neben den cytosolischen Golgi Vesikeln, auch die Zisternen des Golgi Apparates zu erkennen. Diese sind als assymetrische, Strukturen in Kernnähe zu erkennen. Im Überlagerungsbild von cGK1 α und anti Golgin 97 ist eine exakte Übereinstimmung der Position von cGK1 α mit jenen assymetrischen, kernnahen Strukturen zu sehen. Die Lokalisation von cGK1 α konnte somit den Zisternen des Golgi Apparates zugeordnet werden. Sowohl in den KO VSMC wie auch den WT VSMC ist dies zu beobachten. Auch führte eine Stimulation mit 8 Br-cGMP zu keiner Positionsänderung. Erwähnt sei an dieser Stelle noch, dass cGK1 α nur mit keinem der anderen untersuchten Marker kolokalisierte (Daten nicht gezeigt).

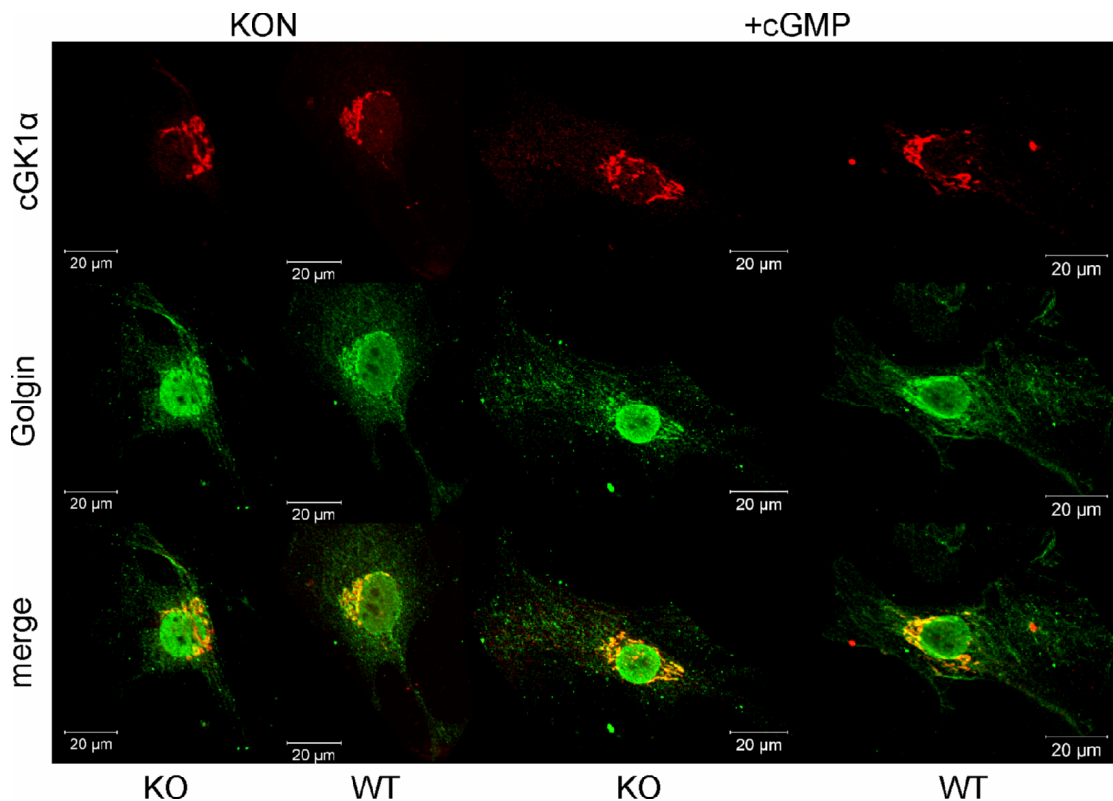


Abbildung 14: Lokalisation von cGK1α in den Zisternen des Golgi Apparates

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt die Kolokalisation von cGK1α mit Golgin 97, einem spezifischen Oberflächenprotein des Golgi Apparates. Bei genauer Betrachtung ist die Lokalisation von cGK1α in den kernnahen Zisternen auszumachen. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

3.2.3.2.2 cGK1β

Bei der Lokalisation von cGK1β wurde eine partielle Kolokalisation mit allen der untersuchten Zellmarker detektiert. So sind in Abbildung 15 mit SERCA 2 speziell im Bereich der kranzförmigen Struktur kolokale Bereiche zu sehen. In Kernnähe, sowie den meisten Teilen des Cytosols war die Kolokalisation beider Proteine nicht sehr ausgeprägt, bzw. nicht vorhanden.

Bei einer Kofärbung mit dem Golgi Marker Golgin 97, konnte cGK1β in den Zisternen des Golgi Apparates nachgewiesen werden. Diese sind in Abbildung 16 in der mittleren Reihe in ihrer typischen kernnahen assymetrischen Verteilung zu erkennen. Die Kolokalisation der beiden Proteine beschränkt sich auf den Bereich der Golgi Zisternen.

Überdies zeigte cGK1β auch eine partielle Kolokalisation mit dem mitochondrialen Netzwerk. Dieses ist in Abbildung 17 in der mittleren Reihe zu sehen. Dieses ist zum Teil in fasrigen Strukturen zu erkennen, welche sich durch das Cytosol ziehen. Diese dürften die Ausrichtung der Mitochondrien an den Mikrotubuli widerspiegeln.

Während SERCA 2 und Golgin 97 nur in wenigen spezialisierten Kompartimenten der Zelle mit cGK1β kolokalisierten, zeigen die Mitochondrien und cGK1β über weite Teile des Cytosols eine gemeinsame Verteilung. Eine Umverteilung von cGK1β durch die

IRAG-Deletion konnte weder in der globalen Verteilung erkannt werden, noch in der relativen Lage der Kinase zu einem der drei betrachteten Zellmarker. Ein Effekt der Inkubation mit 8 Br-cGMP auf die zelluläre Verteilung von cGK1 β konnte zudem nicht beobachtet werden.

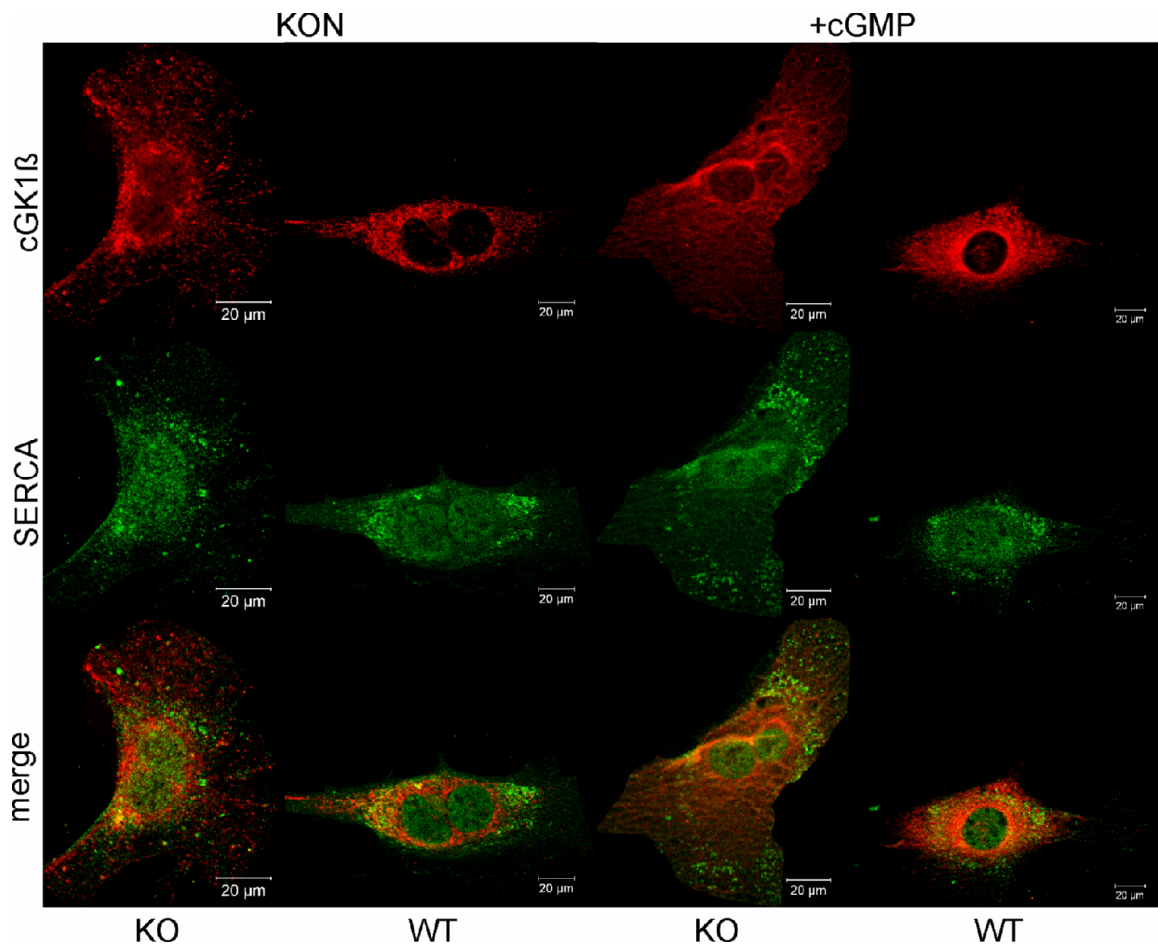


Abbildung 15: Kolokalisation von cGK1 β mit SERCA 2

Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine in jenem Kompartiment des SR, in welchem SERCA als ringförmige Struktur im Cytosol zu erkennen ist. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

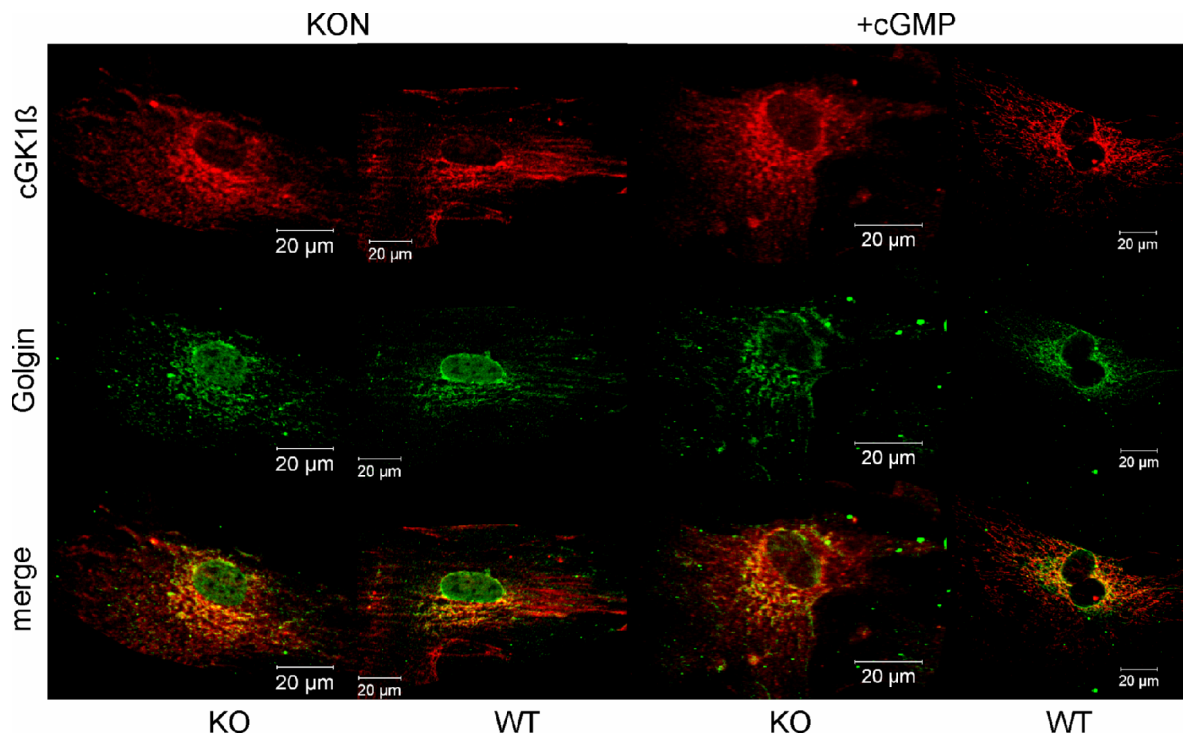


Abbildung 16: Kolokalisation von cGK1 β mit Golgin97

In der konfokalmikroskopischen Aufnahme ist die partielle Kolokalisation von cGK1 β mit Golgin 97 in den kernnahen Zisternen des Golgi Apparates zu erkennen. Unterschiede zwischen WT und KO waren nicht gegeben. Ebenso blieb eine Inkubation mit 8 Br-cGMP ohne Effekt auf die Lokalisation. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

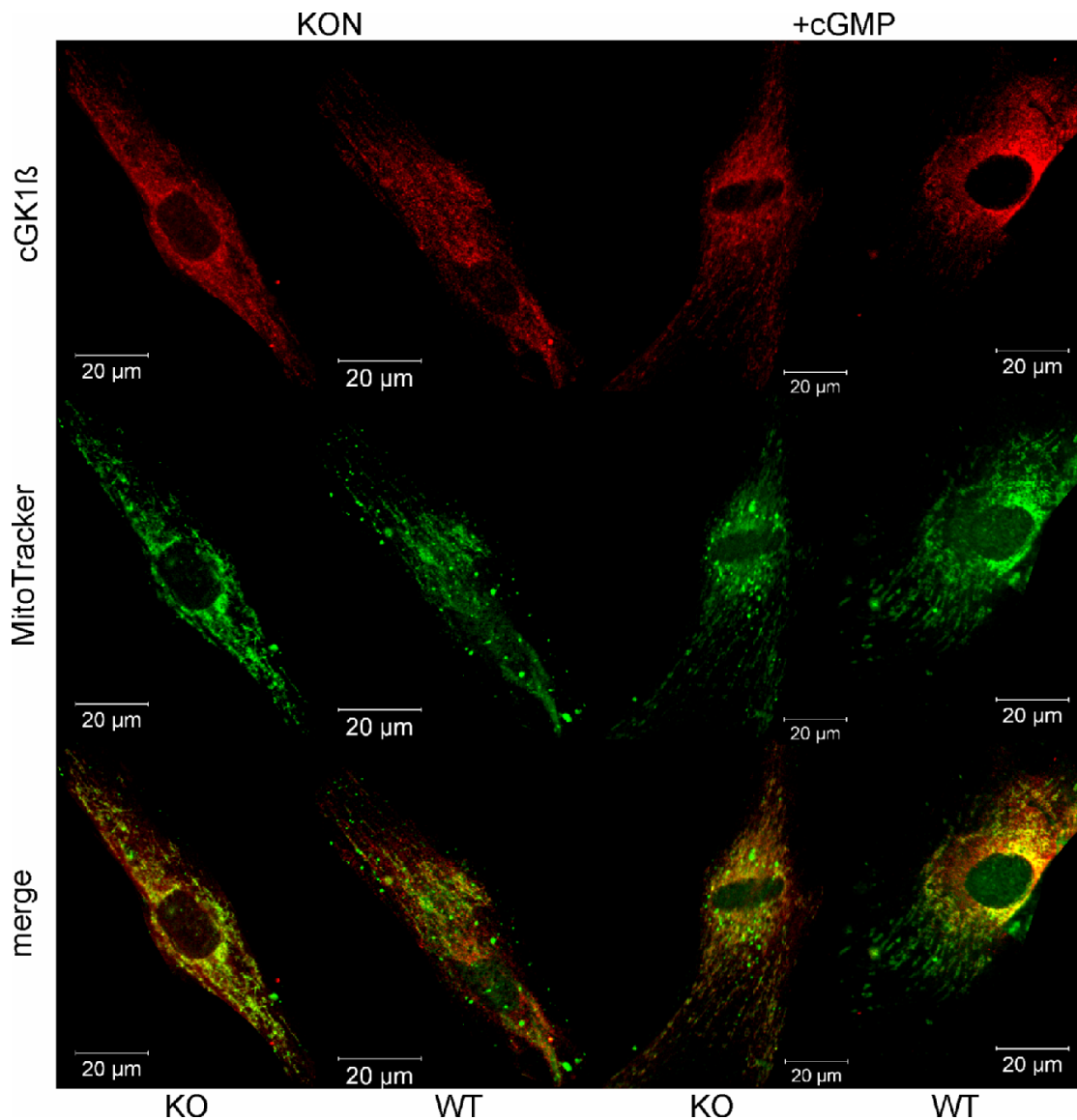


Abbildung 17: Kolokalisation von cGK1 β mit MitoTracker

In der konfokalmikroskopischen Aufnahme ist die partielle Kolokalisation von cGK1 β mit den Mitochondrien in weiten Teilen des Cytosols zu sehen. Unterschiede zwischen WT und KO waren nicht gegeben. Ebenso blieb eine Inkubation mit 8 Br-cGMP ohne Effekt auf die Lokalisation. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

3.2.4 Untersuchung einer möglichen Kerntranslokation der cG-Kinasen

Die Arbeitsgruppe um Frau Pilz zeigte kürzlich an transfizierten BHK Zellen, eine Translokation der cG-Kinasen in den Zellkern bei Aktivierung durch das cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP. Diese Kerntranslokation unterblieb im Falle der cGK1 β bei Koexpression mit IRAG (Casteel, Zhang et al. 2008). Da bei unseren Lokalisationsstudien in VSMC keine Translokation bei Aktivierung von cGK1 β durch 8 Br-cGMP festgestellt werden konnte, wurde ein möglicher Einfluss des verwendeten cGMP Analogons untersucht. Zu diesem Zwecke wurde die Lokalisation von cGK1 β in KO und WT VSMC auch unter dem Einfluss einer einstündigen Vorinkubation mit 250 μ M 8-pCPT-cGMP, analog den Bedingungen der BHK Zelleexperimente, untersucht. In Abbildung 18 ist links die

Lokalisation von cGK1 β zu sehen, rechts ist eine Färbung mit cGK1c AK dargestellt. In beiden Zelllinien ist eine leichte Hintergrundfärbung auch im Bereich des Kerns zu beobachten. Jedoch ist, wie bereits bei Verwendung von 8 Br-cGMP zu sehen, keine Zunahme des Kernsignals bei Inkubation mit 8-pCPT-cGMP zu detektieren.

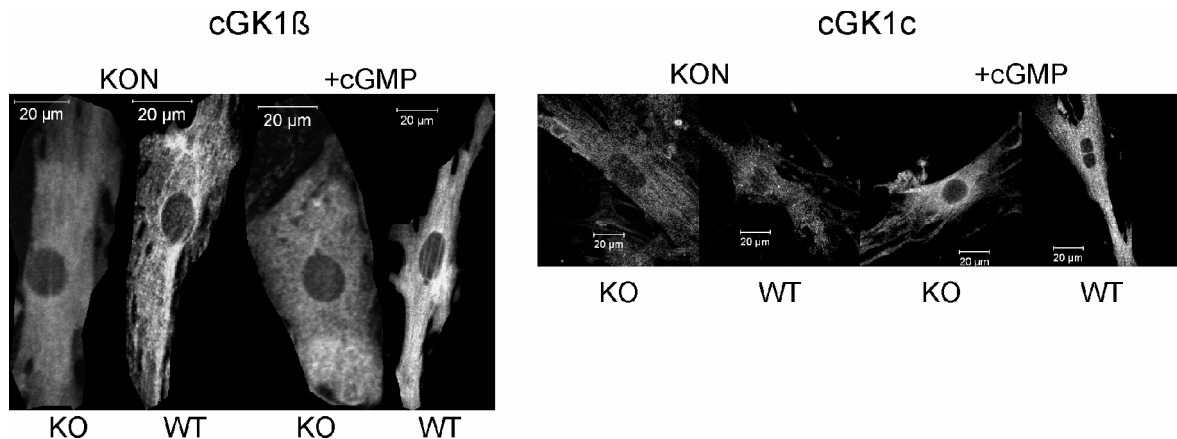


Abbildung 18: Behandlung von VSMC mit 250 μ M 8-pCPT-cGMP

Auch unter dem Einfluss eines alternativen cGMP Analogons ist in der konfokalmikroskopischen Aufnahme keine Kerntranslokation von cGK1 β (linkes Bild) oder cGK1c (rechtes Bild) in den VSMC von WT oder KO zu erkennen. In den jeweils linken Spalten sind die Kontrollen dargestellt, in den jeweils rechten Spalten die mit 250 μ M 8-pCPT-cGMP behandelten VSMC.

3.2.4.1 Überprüfung einer proteolytischen Spaltung von cGK1 α

Eine andere Arbeit konnte bei Stimulation mit 8 Br-cGMP eine proteolytische Spaltung von cGK1 α im Golgi Apparat von pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen zeigen (Sugiura et al. 2008). Hierbei wurde das N-terminale Ende vom C-terminalen Teil abgespalten, welches dann in den Kern translozierte. Um zu untersuchen, ob es sich bei der von uns beobachteten Lokalisation von cGK1 α im Golgi Apparat möglicherweise um das Abbauprodukt der Kinase handelt, wurde der Frage nachgegangen, ob die Signale von N-terminal spezifischen (cGK1 α AK) und cGK1c AK korrelieren. Der cGK1c AK erkennt die 'common' Domäne der cGK1, die alle Domänen der Kinase mit Ausnahme des N-terminalen Bereichs umfasst. Da der cGK1c AK dadurch sowohl cGK1 α als auch cGK1 β erkennt, wurden die Experimente an VSMC der eingangs unter 2.2 beschriebenen cGK1 α rescue Tiere durchgeführt, welche cGK1 α als einzige Variante der cGK1 exprimieren. Diese VSMC wurden analog den WT beziehungsweise IRAG KO VSMC behandelt. In Abbildung 19 ist das Ergebnis einer Färbung der VSMC von cGK1 α rescue Tieren dargestellt. In der oberen Reihe sind in rot die cG-Kinasen dargestellt. Auffällig ist die globale Verteilung von cGK1 α über das gesamte Cytosol, mit einer Intensivierung des Signals in kernnahen Bereichen, wie sie bei den WT Tieren für cGK1 β beobachtet werden konnte. Beim Vergleich der Färbungen von cGK1 α mit cGK1c sind keine Unterschiede in der Verteilung zu erkennen, weder für die Kontrollen, noch für die mit 8 Br-cGMP behandelten VSMC. In der mittleren Reihe ist mittels Golgin 97 der Golgi Apparat

dargestellt. Im Überlagerungsbild zeigen die Färbungen beider cG-Kinase-Antikörper ein hohes Maß an Kolokalisation mit den Zisternen des Golgi Apparates, die sich auch unter dem Einfluss von 8 Br-cGMP nicht verändert. Zudem war weder mit cGK1 α AK, noch mit cGK1c AK eine Zunahme des Kernsignals unter dem Einfluss von 8 Br-cGMP zu beobachten.

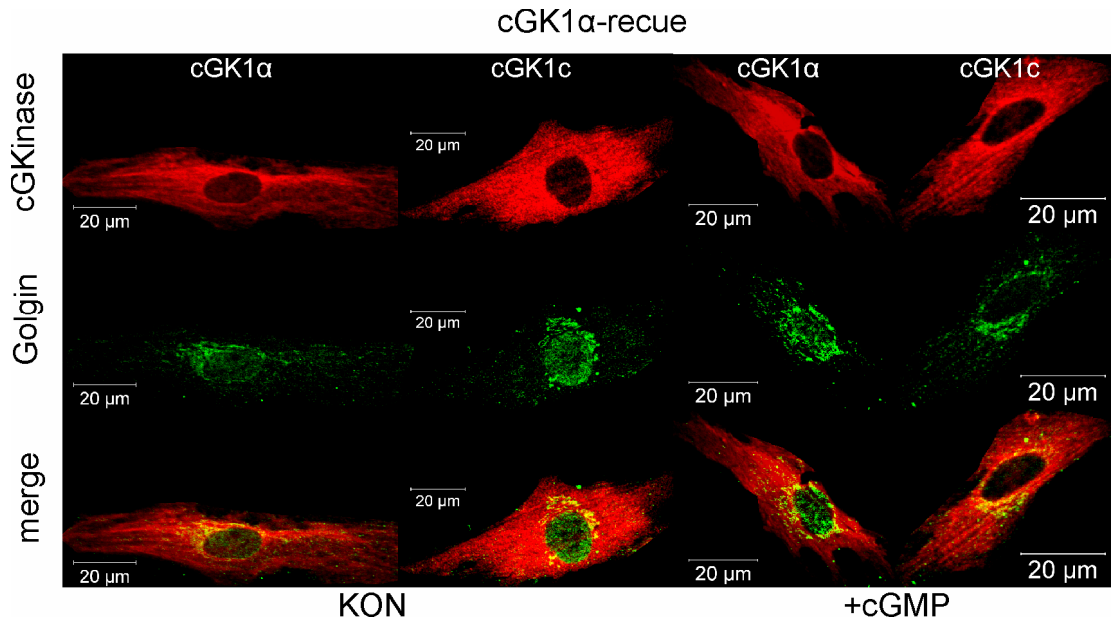


Abbildung 19: Korrelation von N-terminalem Bereich und der 'common' Domäne der cGK1 α
Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt die Färbung von VSMC aus cGK1 α rescue Tieren. Untersucht wurden die mit cGK1 α -, bzw. cGK1c-Antikörper erhaltenen Signale bezüglich ihrer Lage und Kolokalisation mit dem Golgi Apparat. In den Spalten links sind jeweils die Kontrollen dargestellt, in den Spalten rechts die mit 1 mM 8 Br-cGMP behandelten VSMC.

3.2.5 Überprüfung der Kinase Aktivität

Da in den vorangegangenen Experimenten kein Effekt der Aktivierung der cGK1 beobachtet werden konnte, wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob die Kinasen unter den gewählten Bedingungen überhaupt eine Aktivierung zeigten. Hierzu wurden die VSMC nach dem bereits verwendeten Protokoll mit 8 Br-cGMP inkubiert und anschließend mit Antikörpern gefärbt, welche die phosphorylierten Varianten typischer cGK1 Substrate erkannten. Hierbei kamen zum Einsatz: Phospho-IP₃R1 (Ser 1755) (Komalavilas and Lincoln 1996), Phospho-Phospholamban (Ser 16) (Lalli, Shimizu et al. 1999) und Phospho-VASP (Ser 239). Während Serin 1755 des IP₃R1, sowie Serin 16 von Phospholamban sowohl durch PKA, wie auch cGK1 phosphoryliert werden können, gilt die VASP Phosphorylierungsstelle als spezifisch für cGK1 (Butt et al. 1994).

Um das Ausmaß der Stärke der Phosphorylierung zu beurteilen, wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals von stimulierter zu unstimulierter Probe verglichen. Hierzu wurden je 6 zufällig gewählte Abschnitte beider Proben gleich lang belichtet und die erhaltene Signalstärke bei linearer Darstellung des Schwarz-Weiß-Kontrastes dargestellt. Um ein Ausbleichen der Probe und damit eine Reduktion der Fluoreszenzintensitäten zu

vermeiden, wurde jede Kammer der BD Objektträger nur 6-mal photographiert. Die Versuche wurden für jede Bedingung mindestens 2-mal, mit Zellen aus mindestens 4 verschiedenen Tieren durchgeführt. Dabei war bei allen verwendeten Substraten sowohl in den KO VSMC, wie auch den WT VSMC eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Behandlung mit 8 Br-cGMP zu beobachten.

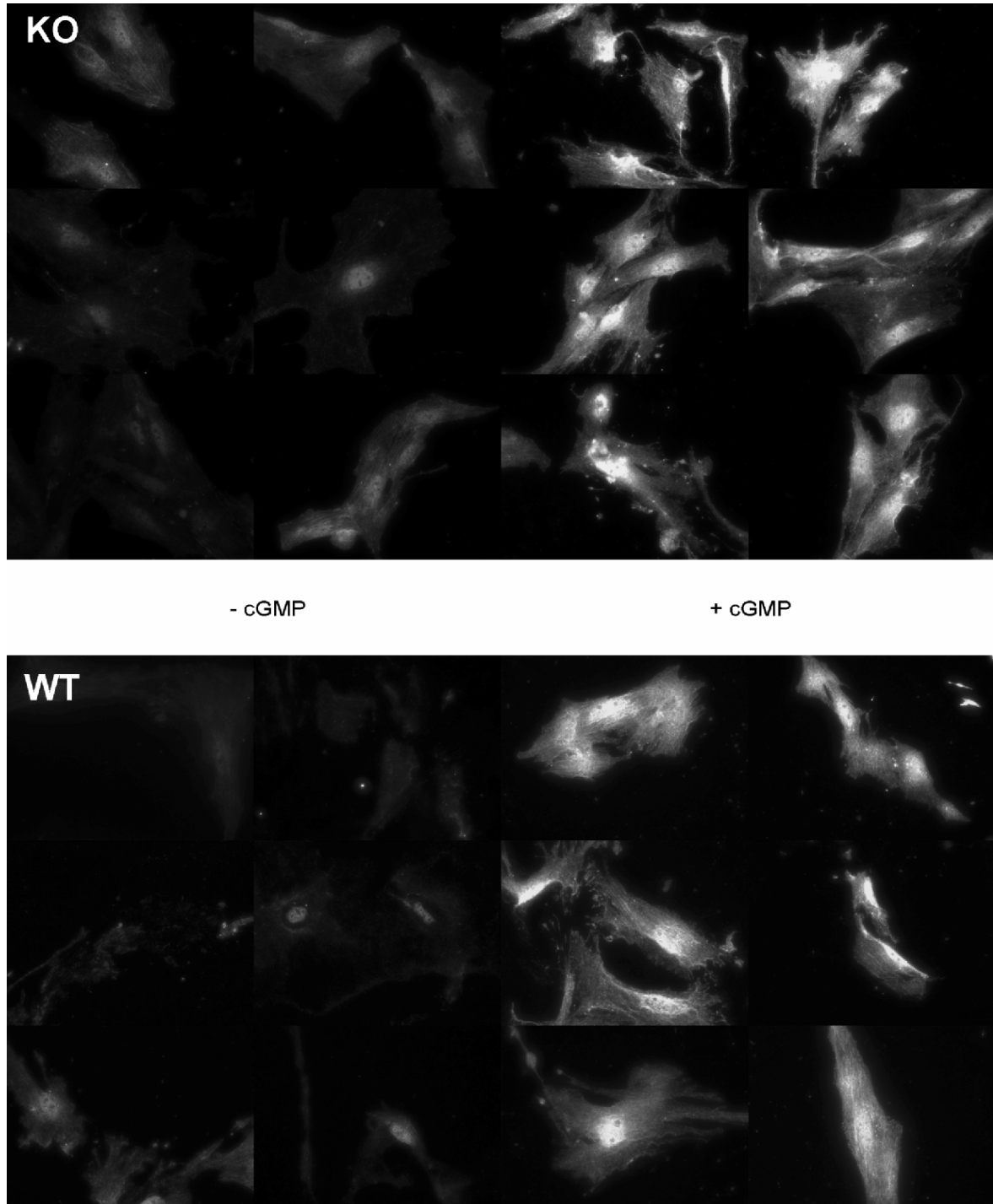


Abbildung 20: Phosphorylierung von IP₃R1

Die Abbildung zeigt zufällige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Kultur aus WT und KO VSMC in 400 facher Vergrößerung. Die VSMC wurden mit Antikörpern gegen phosphorylierten IP₃R1 (Ser 1755) gefärbt. Die Belichtungszeit lag bei 130 ms. Links im Bild sind unstimulierte Zellen zu sehen, rechts wurde mit 1mM 8 Br-cGMP vorinkubiert. Sowohl in KO wie auch WT VSMC ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der stimulierten Zellen zu beobachten.

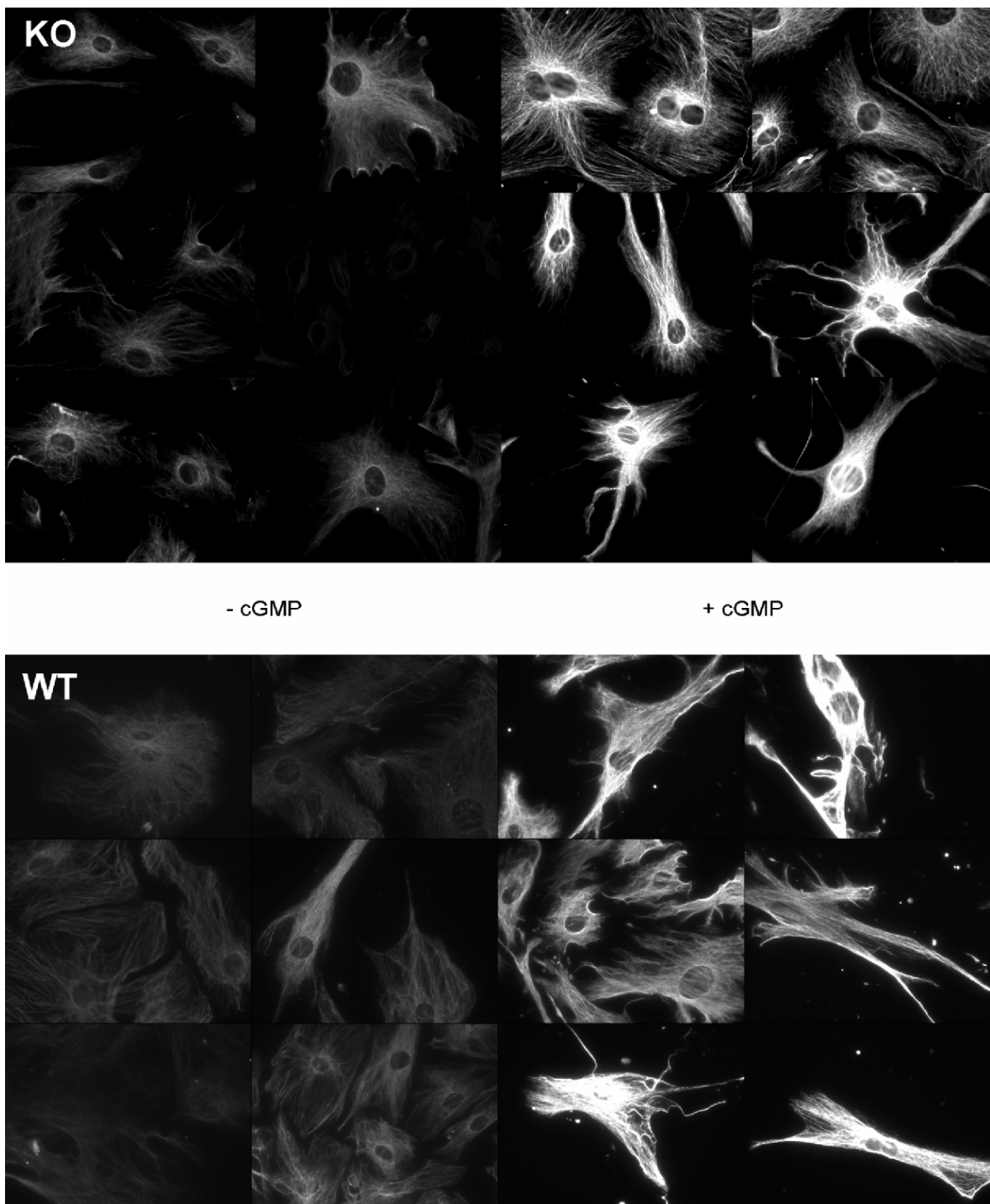


Abbildung 21: Phosphorylierung von Phospholamban

Die Abbildung zeigt zufällige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Kultur aus WT und KO VSMC in 400 facher Vergrößerung. Die VSMC wurden mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Phospholamban (Ser 16) gefärbt. Die Belichtungszeit lag bei 70 ms. Links im Bild sind unstimulierte Zellen zu sehen, rechts wurde mit 1mM 8 Br-cGMP vorinkubiert. Sowohl in KO wie auch WT VSMC ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der stimulierten Zellen zu beobachten.

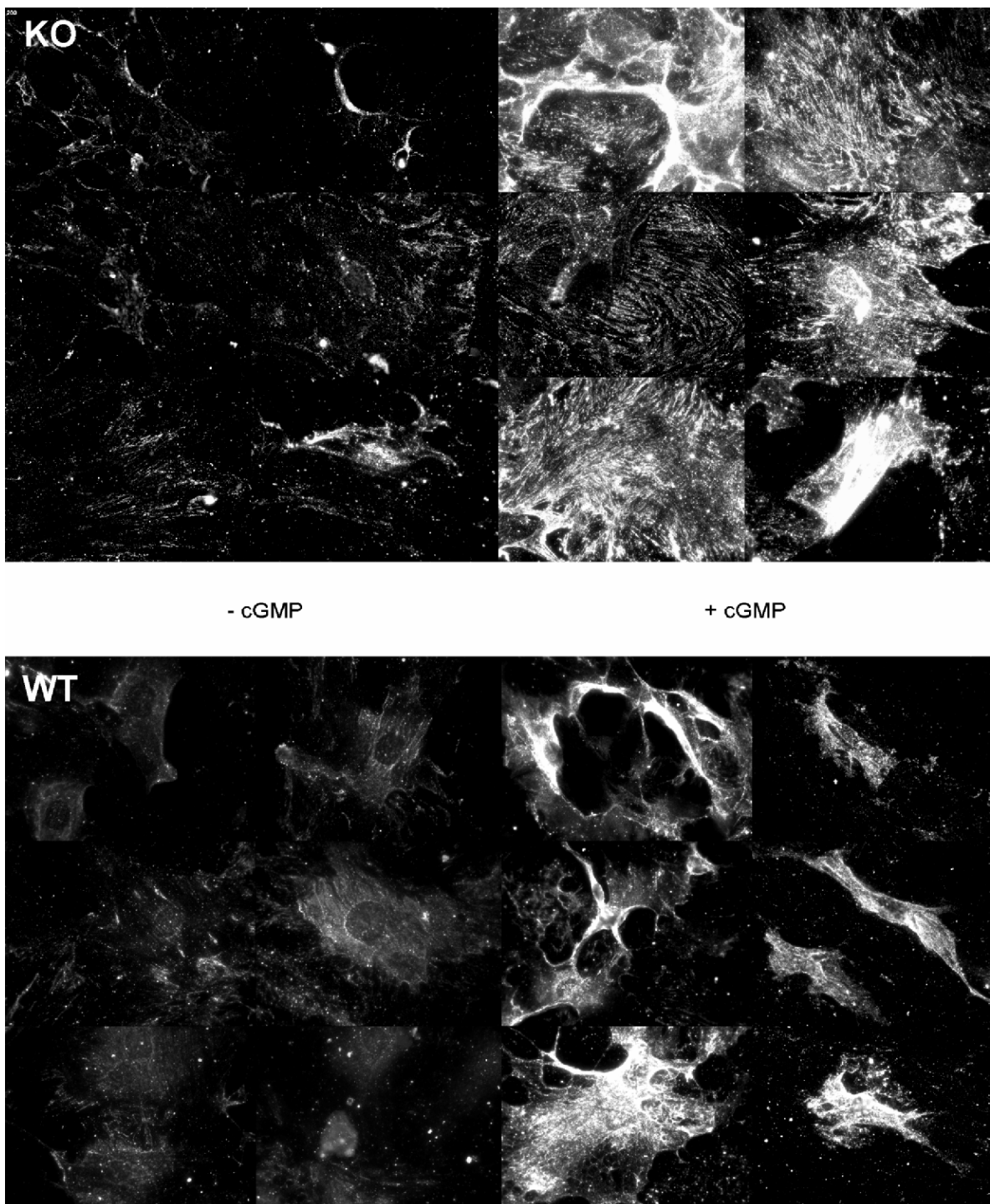


Abbildung 22: Phosphorylierung von VASP

Die Abbildung zeigt zufällige fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Kultur aus WT und KO VSMC in 400 facher Vergrößerung. Die VSMC wurden mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes VASP (Ser 239) gefärbt wurden. Die Belichtungszeit lag bei 200 ms. Links im Bild sind unstimulierte Zellen zu sehen, rechts wurde mit 1mM 8 Br-cGMP vorinkubiert. Sowohl in KO wie auch WT VSMC ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der stimulierten Zellen zu beobachten.

3.3 Calcium Messungen

Die Messungen des folgenden Kapitels wurden alle an IRAG KO VSMC im Vergleich zu WT VSMC durchgeführt. Der Messstand des T.I.L.L Systems wurde zu Beginn unter 2.6.2 eingehend erörtert, die reine Durchführung der Messung ist unter 2.7 beschrieben. Abbildung 23 zeigt mit Fura 2 beladene WT VSMC vor Beginn der Messung.

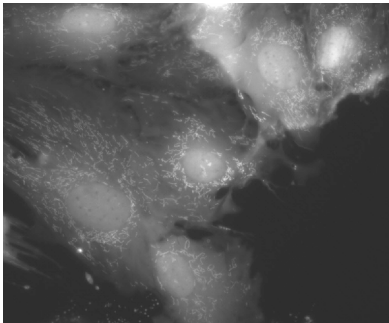


Abbildung 23: WT VSMC mit Fura 2 beladen

3.3.1 Effekt von IRAG auf Hormon induzierte Calcium Signale

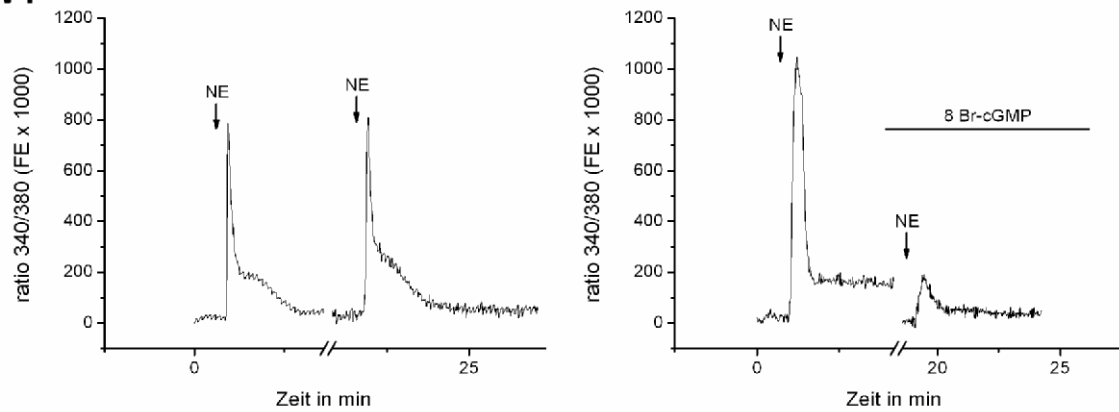
Durch Experimente an Cos-Zellen und VSMC von IRAG $\Delta 12$ Mäusen konnte bereits die Bedeutung von IRAG für die Calciumhomöostase dieser Zellen etabliert werden (Geiselhoring, Werner et al. 2004b). IRAG $\Delta 12$ Mutanten exprimieren im Gegensatz zu IRAG KO Tieren aber nach wie vor ein Fragment des IRAG Proteins, welches cGK1 β noch immer bindet. Deshalb sollte hier, durch die Analyse von IRAG KO VSMC, der Frage nachgegangen werden, ob dieser Effekt durch das verbliebene IRAG Fragment verursacht wurde, oder auf der fehlenden Inhibierung des IP₃R1 durch IRAG beruhte. Um einen Effekt auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration untersuchen zu können, wurde in den VSMC zunächst mit 50 μ l einer 0.5 μ M Norepinephrinlösung (NE) ein Calciumtransient ausgelöst. Das Hormon wurde hierzu mit einer Glaskapillare direkt auf die VSMC gegeben. Nach dem Abfall des Calciumsignals auf basales Niveau, wurde fünf Minuten lang mit Tyrode gespült, um überschüssiges Hormon aus dem Bad zu entfernen. Nach diesem Waschschritt erfolgte eine Ruhephase (Basalert), oder Inkubation mit typischen Aktivatoren des cGMP/cGK-Signalweges (Messwert). Hierbei wurde, beziehend auf die bekannten Aktivierungsmechanismen, der Effekt einer direkten Aktivierung der cG-Kinase, mittels cGMP Analoga getestet. Zum anderen wurde der Effekt einer indirekten Aktivierung mittels partikulärer Guanylatzyklasen durch natriuretische Peptide, sowie mittels löslicher Guanylatzyklase durch NO-Donatoren untersucht. Nach dieser Ruhephase/Inkubation wurde durch erneute Gabe von 50 μ l der 0.5 μ M Norepinephrinlösung in Gegenwart der Substanzen ein zweiter Calciumtransient ausgelöst. Das Ausmaß der Calciumausschüttung wurde dabei als die Fläche unter der Kurve (AUC) der Calciumtransienten bestimmt, die Einheit ist mit Fluoreszenz Einheiten x 1000 (FE x 1000) angegeben. Das Verhältnis AUC2/AUC1 der Messwerte wurde dabei in

Relation zum Verhältnis $AUC2/AUC1$ der Basalwerte angegeben. Durch diese Vorgehensweise konnten Unterschiede in der Erregbarkeit der unterschiedlichen VSMC Populationen ausgeglichen werden, zudem war durch die Bestimmung des Kontrolltransienten eine interne Standardisierung innerhalb der einzelnen VSMC gewährleistet. Zudem spiegelte die Fläche unter der Kurve das Ausmaß der Calciumfreisetzung besser wieder als eine Bestimmung der Höhe der Transienten, da Zellen mit zunehmender Entfernung von der Kapillare durch das langsamere Anfluten des Hormons dazu neigten mit einem längeren, aber niedrigeren Transienten zu reagieren.

3.3.1.1 Effekt von 8 Br-cGMP

Um eine direkte Aktivierung der cG-Kinase zu erreichen, wurde zwischen den beiden Transienten 5 Minuten mit einer 2 mM 8 Br-cGMP Lösung inkubiert. Dabei war das Ausmaß der Calciumfreisetzung durch NE in Gegenwart von 8 Br-cGMP in den WT VSMC signifikant verringert. Das Verhältnis von $AUC2/AUC1$ war bei der Inkubation mit 8 Br-cGMP in den WT VSMC auf 69.3 ± 5.1 % der Basalwerte verringert. Diese Reduktion war mit einem p-Wert von 0.0042 hochsignifikant. Dagegen hatte eine Inkubation mit 8 Br-cGMP keinen Effekt auf VSMC aus IRAG KO Tieren. $AUC2/AUC1$ war sogar leicht erhöht auf 109.7 ± 10.4 %, jedoch bei einem p-Wert von 0.5008 nicht signifikant. Das Ergebnis einer solchen Messung ist in Abbildung 24 dargestellt. Das gleiche Experiment wurde bereits von Frau Angela Jochim am Institut für Pharmakologie am Biederstein in München durchgeführt, wurde hier aber wiederholt, um zum einen die Methodik zu etablieren und zum anderen die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen dabei in sehr guter Näherung denen von Frau Jochim die in den WT VSMC eine hochsignifikante Reduktion auf 74 % bei einem p-Wert von 0.007 beobachten konnte und einen nichtsignifikanten Anstieg ($p = 0.517$) in den KO VSMC auf 104 %.

WT



KO

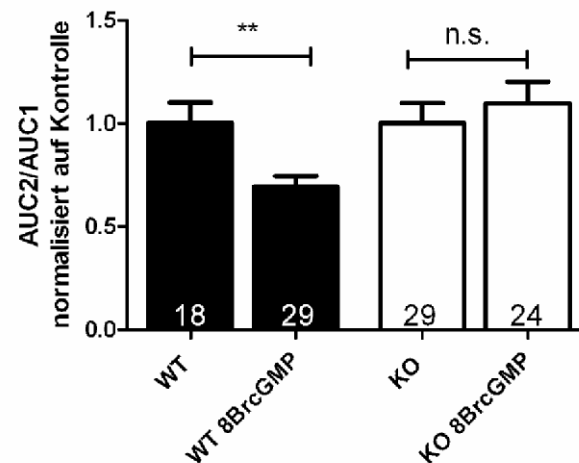
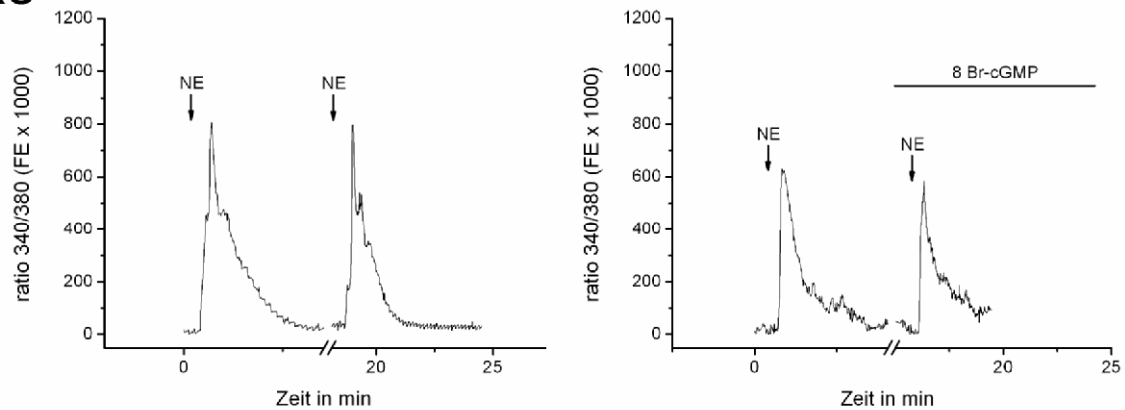


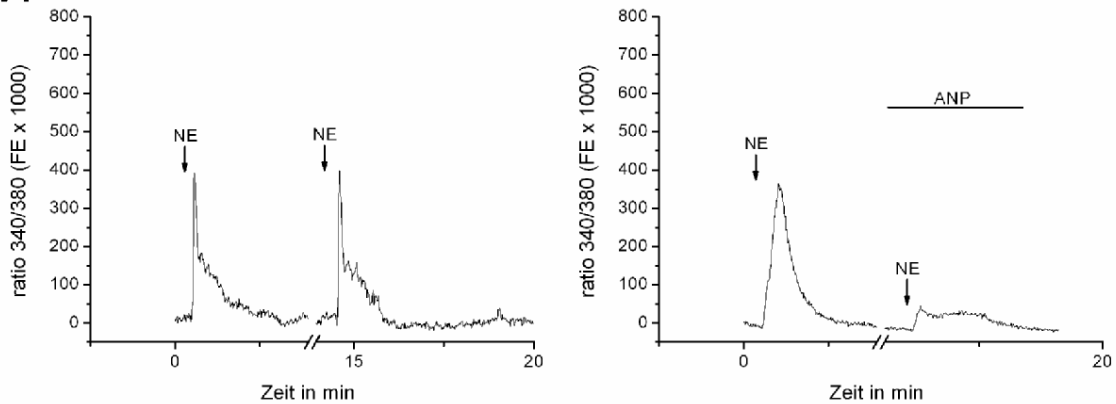
Abbildung 24: Effekt von 8 Br-cGMP auf Hormon vermittelte Calciumtransienten

Die Graphen zeigen exemplarische Originalaufzeichnungen der Untersuchung der Hormon vermittelten Calciumtransienten in VSMC von WT und IRAG KO Tieren. Zu beobachten ist eine hochsignifikante Verringerung der Calciumausschüttung in Gegenwart von 2 mM 8 Br-cGMP in den WT VSMC. In den KO VSMC führte diese Inkubation zu einer tendenziellen Zunahme des zweiten Transienten. Im Balkendiagramm ist die statistische Zusammenfassung dargestellt. Die dargestellten Werte wurden dabei jeweils auf den Mittelwert der Basalwerte bezogen. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat aus 5 – 11 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 verschiedenen Mäusen.

3.3.1.2 Effekt von Atrialelem Natriuretischem Peptid

Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied auch bei einer Aktivierung der cGK1 durch endogenes cGMP besteht, wurden die Zellen mit einer 100 nM Lösung ANP, zur Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase, für fünf Minuten inkubiert. Auch hier war eine signifikante Hemmung des zweiten Calciumtransienten der WT VSMC in Gegenwart des Peptids zu verzeichnen. Mit einer Reduktion der AUC2/AUC1 auf 65.3 ± 3.1 % der Basalwerte und einem p-Wert < 0.0001 war diese Reduktion höchstsignifikant. Bei den KO VSMC war abermals ein leichter allerdings nicht signifikanter Anstieg auf 116.8 ± 9.6 % der Basalwerte mit einem p-Wert von 0.1097 zu beobachten.

WT



KO

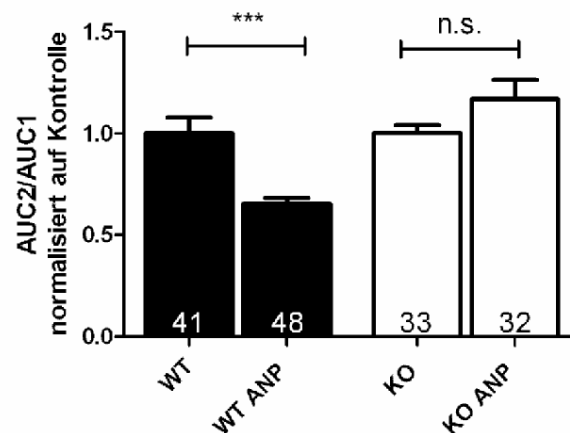
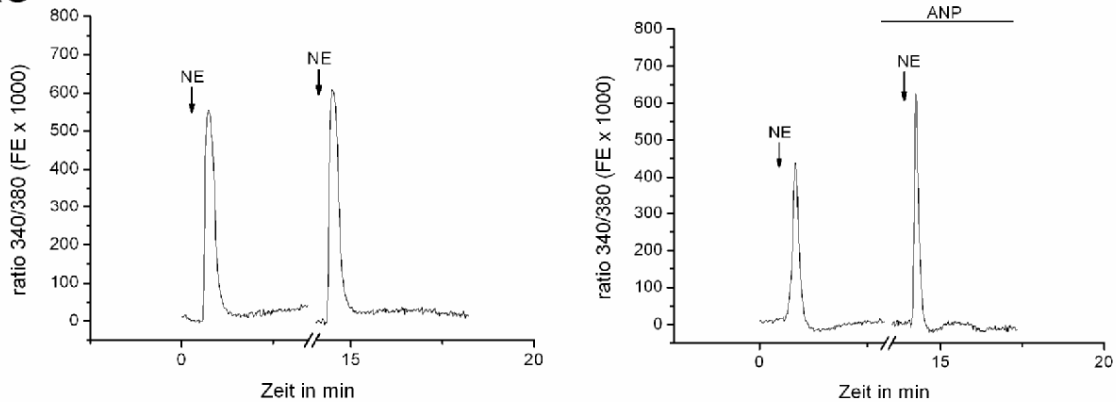


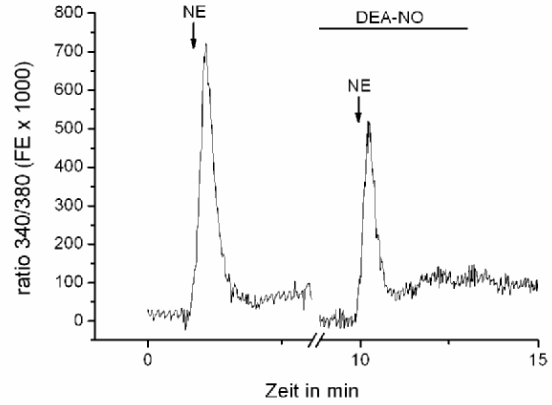
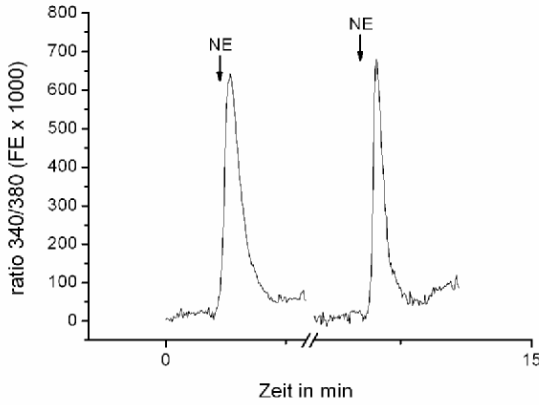
Abbildung 25: Effekt von ANP auf Hormon vermittelte Calciumtransienten

Die Graphen zeigen exemplarische Originalaufzeichnungen der Hormon vermittelten Calciumtransienten in VSMC von WT und IRAG KO Tieren. Dabei ist eine höchstsignifikante Verringerung der Calciumausschüttung in Gegenwart von 100 nM ANP in den WT VSMC zu sehen. In den KO VSMC führte diese Inkubation zu einer tendenziellen Zunahme des zweiten Transienten. Im Balkendiagramm ist die statistische Zusammenfassung dargestellt. Die dargestellten Werte wurden dabei jeweils auf den Mittelwert der Basalwerte bezogen. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat aus 5 – 8 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 verschiedenen Mäusen.

3.3.1.3 Effekt von DEA-NO

Zur Bildung endogenen cGMPs durch die lösliche Guanylatzyklase wurde 10 μ M DEA-NO verwandt. Dieses zerfällt mit einer Halbwertszeit von 2 Minuten bei 37°C und setzt dabei NO frei. Wegen der schnellen Freisetzung und geringen Stabilität des NO-Radikals wurde hier nur eine Minute vorinkubiert. Auch hier ist eine Reduktion der Calciumfreisetzung in den WT VSMC bei indirekter Aktivierung der cGK1 durch DEA-NO zu beobachten. Diese betrug 78.6 ± 5.7 % des Basalwertes und war mit einem p-Wert von 0.0424 signifikant. Auch bei den KO VSMC bewirkte die Gegenwart von DEA-NO eine Reduktion der Calciumfreisetzung, mit einer Reduktion auf 85.1 ± 7.7 % des Basalwertes, bei einem p-Wert von 0.279 war dieser Effekt allerdings nicht signifikant.

WT



KO

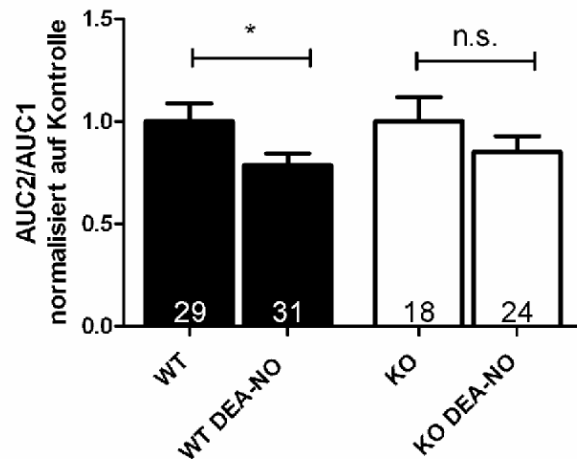
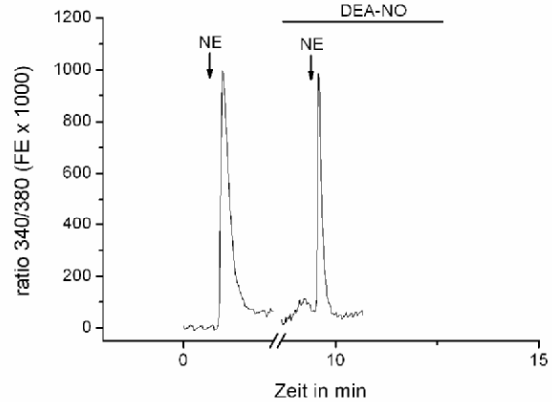
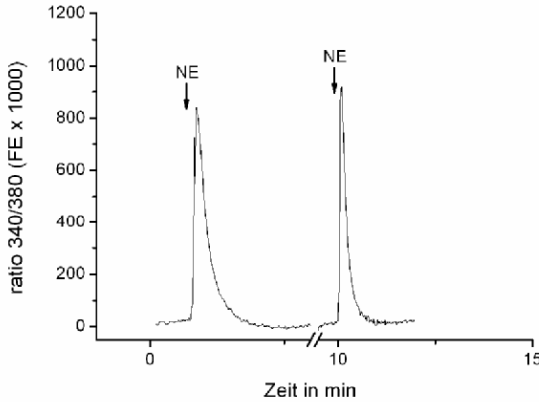


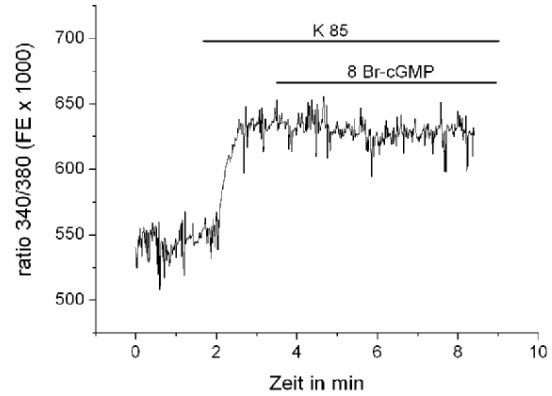
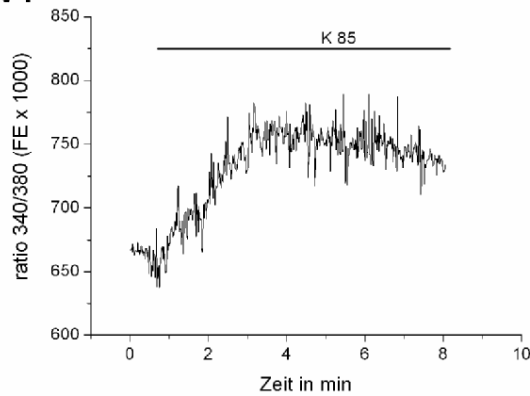
Abbildung 26: Effekt von DEA-NO auf Hormon vermittelte Calciumtransienten

Die Graphen zeigen exemplarische Originalaufzeichnungen der Hormon vermittelten Calciumtransienten in VSMC von WT und IRAG KO Tieren. Dabei ist eine signifikante Verringerung der Calciumausschüttung in Gegenwart von 10 μ M DEA-NO in den WT VSMC zu sehen. In den KO VSMC führte diese Inkubation zu einer tendenziellen Abnahme der Calciumausschüttung. Im Balkendiagramm ist die statistische Zusammenfassung dargestellt. Die dargestellten Werte wurden dabei jeweils auf den Mittelwert der Basalwerte bezogen. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat aus 4 - 9 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 verschiedenen Mäusen.

3.3.2 Effekt von IRAG auf spannungsabhängigen Calciumeinstrom

Um den Effekt von IRAG auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom zu untersuchen, wurden die Zellen mit K85 Tyrode umspült. Durch den hohen Gehalt an Kalium im Puffer kommt es infolge des verminderten Ausstroms von Kalium aus der Zelle zur Membrandepolarisation. Aus dieser Depolarisation resultiert ein Öffnen spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanäle (Cav1.2) infolge dessen es zum Einstrom von Calcium kommt. Der durch K85 bedingte Calciumeinstrom betrug 110.0 ± 6.2 FE für die WT VSMC und unterschied sich damit nicht signifikant von dem der KO VSMC (123.5 ± 7.9 FE; $p = 0,1731$). Um die Wirkung von 8 Br-cGMP auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom zu testen, wurde nach Erreichen des maximalen K85 Signals 1 mM 8 Br-cGMP zugegeben und für fünf Minuten inkubiert. Um den in dieser Zeit auftretenden Verlust an Signalstärke nicht als Wirkung von 8 Br-cGMP zu identifizieren, wurde der erhaltene Wert in Relation zu dem der Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt angegeben. Dieser betrug 97.3 ± 4.2 % für die WT VSMC und 94.0 ± 4.8 % für die VSMC aus KO Tieren. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war mit $p = 0.6142$ statistisch nicht signifikant. Zudem war der durch 8 Br-cGMP verursachte Rückgang des Calciumsignals in sowohl WT, wie auch KO VSMC, nicht signifikant unterschiedlich zu dem der Kontrollen ohne cGMP Inkubation.

WT



KO

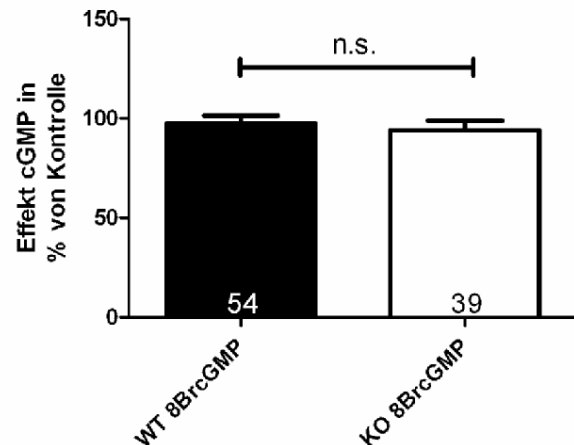
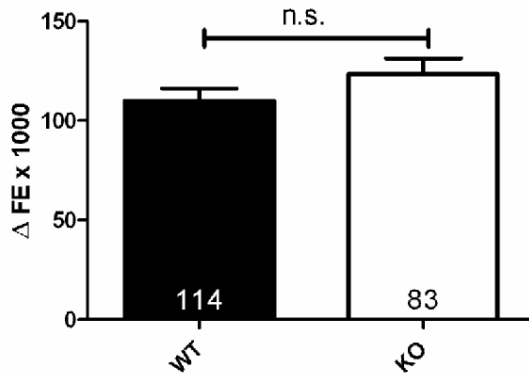
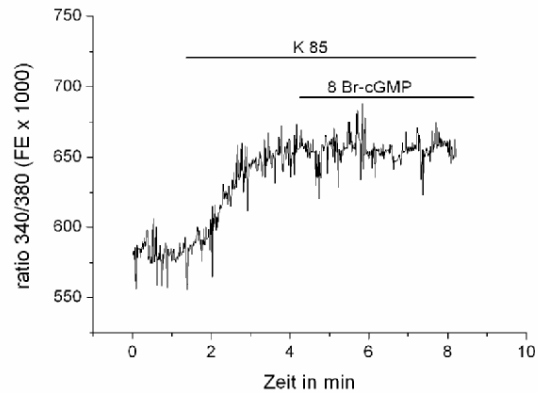
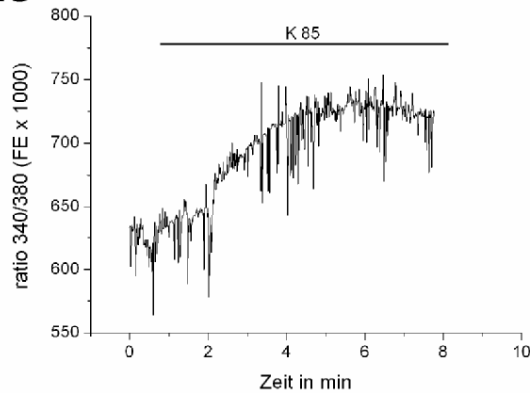


Abbildung 27: Einfluss von IRAG auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom

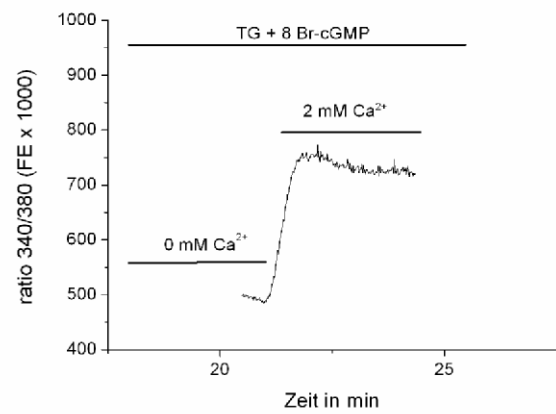
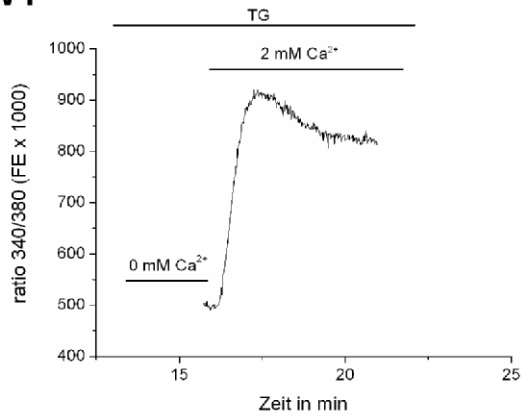
Die Abbildung zeigt den Effekt von 1 mM 8 Br-cGMP auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom von WT und KO VSMC. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der durch Depolarisation verursachte Calciumeinstrom ist in WT VSMC nicht signifikant unterschiedlich zu dem in KO VSMC. Bei beiden Zelllinien kann der durch K85 verursachte Calciumeinstrom durch 8 Br-cGMP nicht signifikant vermindert werden. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Links ist der absolute Effekt von K85 auf WT und KO VSMC gegeben, rechts die prozentuale Hemmung durch 8 Br-cGMP normalisiert auf die Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 12 - 24 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 - 12 Mäusen.

3.3.3 Effekt von IRAG auf kapazitiven Calcium Einstrom

Als kapazitiver Calcium Einstrom, oder Store Operated Calcium Entry (SOCE) wird ein Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum bezeichnet, der als Folge einer Calciumfreisetzung aus dem SR auftritt. Auslösendes Element ist hierbei das Absinken intraretikulärer Calciumspiegel. Um den SOCE zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst mit dem SERCA Inhibitor Thapsigargin (TG) behandelt. Nach einer einmaligen Bolusgabe von 2 μM TG direkt ins Bad, stellte sich ein steter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ein, infolge des 'Leerlaufens' des SR. Danach war TG für die Dauer des gesamten Experiments in einer Konzentration von 1 μM in allen Lösungen. Um eine vollständige Calciumentspeicherung und geeignete Messbedingungen zu schaffen, wurde im folgenden Schritt extrazelluläres Calcium entfernt. Hierzu wurde über einen Zeitraum von 3 Minuten 5 ml calciumfreie Tyrode eingewaschen und weitere 10 Minuten inkubiert, bis sich ein stabiles Calciumsignal einstellte. Sollte der Effekt von Substanzen auf den SOCE untersucht werden, wurden diese in diesem Zeitraum mit inkubiert. Anschließend wurde durch erneutes Einwaschen Calciumhaltiger (2 mM) Tyrode, bei entspeichertem SR, der SOCE ausgelöst. Dieser wurde dabei als der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gemessen und wurde bestimmt als die Höhe des auftretenden Anstiegs in Fluoreszenz Einheiten ($\text{FE} \times 1000$). ($\text{FE} \times 1000$) wird im fortlaufenden Text als fe angegeben.

Bei Bestimmung des SOCE in VSMC aus WT Tieren konnte dabei ein Wert von 480.2 ± 35.8 fe ermittelt werden. In Gegenwart von 1 mM 8 Br-cGMP ließ sich der mittlere Calciumeinstrom auf 279.7 ± 25.9 fe erniedrigen und war damit bei einem p-Wert von 0.0002 höchstsignifikant vermindert. Dies entspricht einer prozentualen Hemmung auf $58.3 \pm 9,3$ %. Bei gleicher Behandlung der VSMC von KO Tieren betrug der durch Calciumeinstrom verursachte Fluoreszenzanstieg 423.4 ± 38.6 fe für die Kontrollen und 374.1 ± 36.3 fe für die mit 8 Br-cGMP behandelten VSMC. Der Unterschied war bei einem p-Wert von 0.36 nicht signifikant. Auch war der Unterschied zwischen den WT Kontrollen und denen der KO VSMC nicht signifikant.

WT



KO

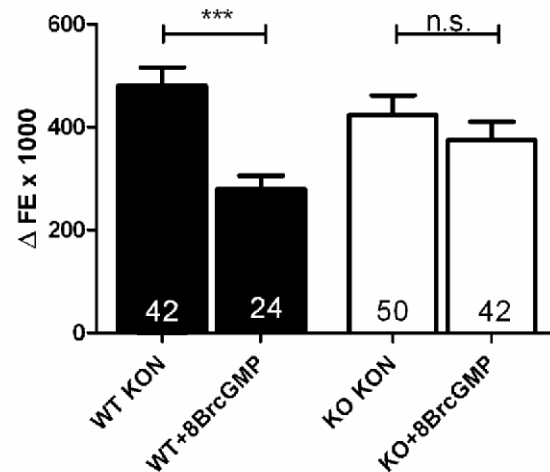
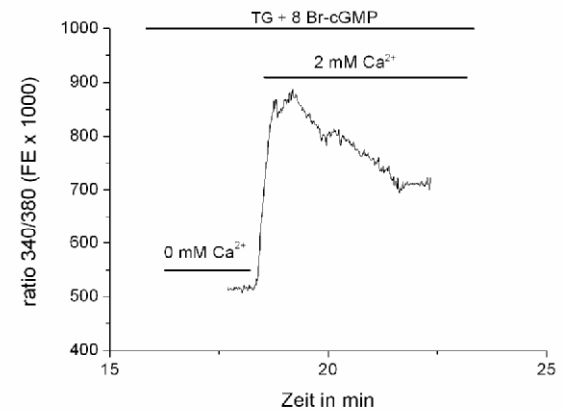
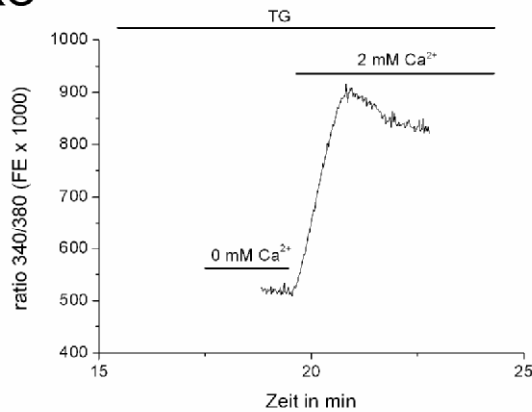
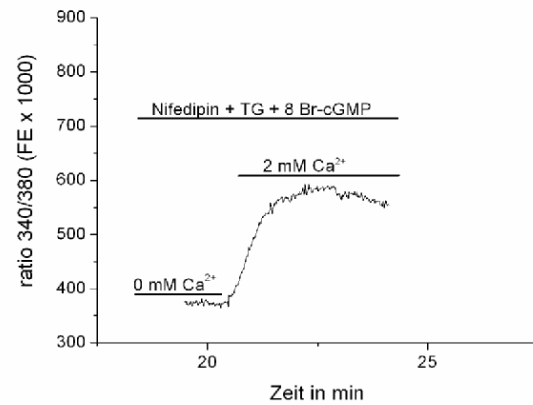
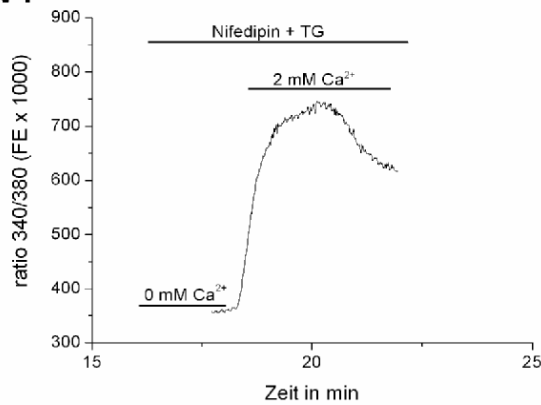


Abbildung 28: Effekt von IRAG auf 8 Br-cGMP vermittelte SOCE und VOCE Inhibierung

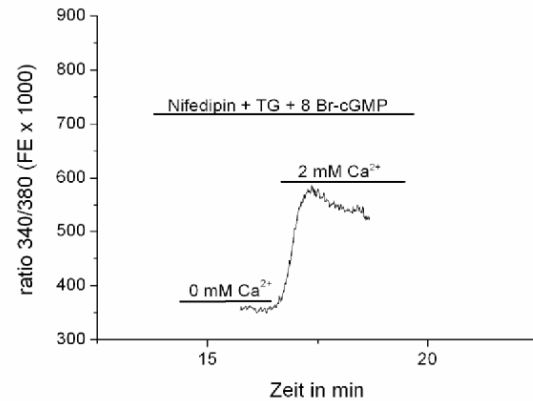
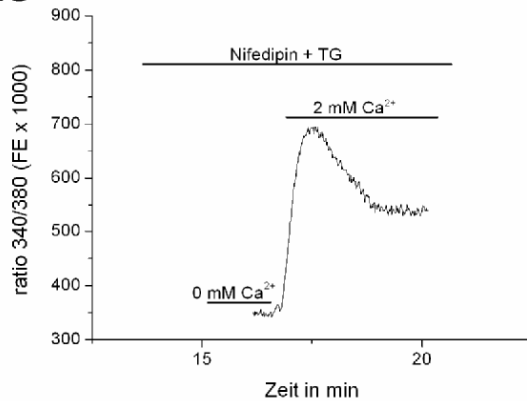
Die Abbildung zeigt den Effekt von 1 mM 8 Br-cGMP auf den SOCE von WT und KO VSMC. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE ist in WT VSMC signifikant hemmbar, in KO VSMC nicht. Das Balkendiagramm gibt die statistische Auswertung der Versuche an. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 7 – 12 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen.

Da im Rahmen des SOCE auch unspezifische Kationenkanäle aktiviert werden, die sowohl für Calcium, wie auch Natrium durchlässig sind, könnte die daraus resultierende Membrandepolarisation spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle (Cav1.2) aktivieren. Zur genaueren Untersuchung des resultierenden Calciumeinstroms wurden diese mit Nifedipin inhibiert. Nifedipin wurde bereits vor Beginn der Messung appliziert und war für die Dauer der gesamten Messung in einer Konzentration von 10 μM im Bad. Bei Gegenwart von Nifedipin konnte in den VSMC aus WT Tieren ein mittlerer SOCE von 326.8 ± 27.7 fe erzielt werden. Demgegenüber steht ein Wert von 231.4 ± 20.4 fe bei Gegenwart von 1 mM 8-Br-cGMP. Mit einem p-Wert von 0.0067 ist dieser Effekt hochsignifikant. In den Kontrollen der KO VSMC konnte ein SOCE von 333.3 ± 27.5 fe erreicht werden, der sich statistisch nicht von den WT Kontrollen unterschied. Interessanterweise konnte aber bei Inkubation mit 8-Br-cGMP eine ebenso hochsignifikante Reduktion ($p = 0.0012$) auf 224.2 ± 17.0 fe in den KO VSMC erreicht werden. Die Hemmung auf 70.8 ± 6.2 % für die WT VSMC war dabei nicht unterschiedlich zu denen der KO VSMC auf 67.3 ± 5.1 %.

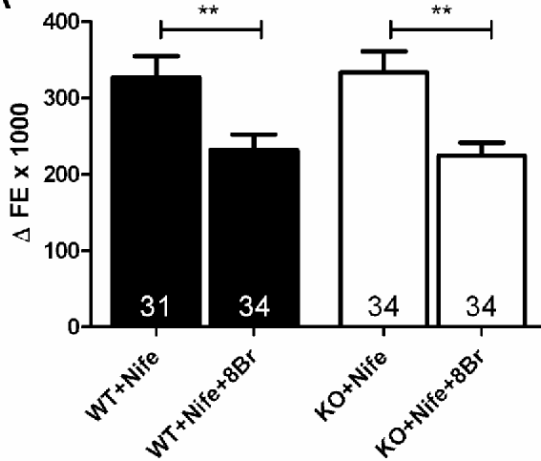
WT



KO



A



B

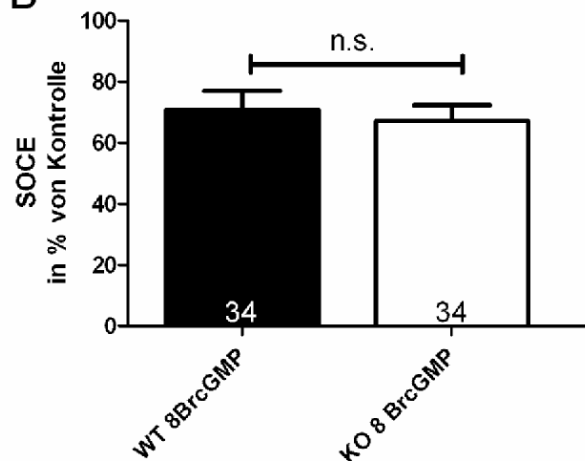


Abbildung 29: Effekt von IRAG auf 8 Br-cGMP vermittelte SOCE Inhibierung

Die Abbildung zeigt den Effekt von 1 mM 8 Br-cGMP auf den SOCE in Gegenwart von 10 μ M Nifedipin. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE ist sowohl in WT VSMC, wie auch KO VSMC signifikant hemmbar. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von 8 Br-cGMP in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 9 – 11 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen.

Dies zeigt, dass ohne den Nifedipin inhibierbaren Calciumeinstrom der reine SOCE in beiden Zelllinien durch 1 mM 8 Br-cGMP hemmbar ist. Allerdings wird diese Hemmbarkeit

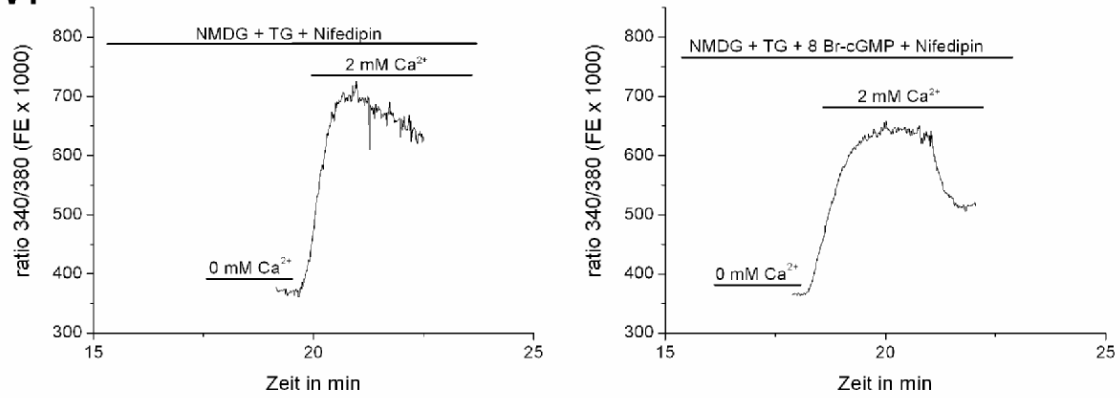
in den KO VSMC bei Abwesenheit von Nifedipin offensichtlich durch einen Calciumeinstrom überlagert, der in den WT VSMC nicht gegeben ist. Da Nifedipin als selektiv gilt und eine Konzentration von 10 μM bei SOCE Messungen gebräuchlich ist (Baryshnikov, Pulina et al. 2009; Forrest et al. 2010), wurde in den folgenden Versuchen von einem Cav1.2 verursachten Unterschied ausgegangen. Da bei den Depolarisationsversuchen mit K85 keine Unterschiede zwischen WT und KO VSMC festgestellt werden konnten, ist ein direkter Einfluss von IRAG auf Cav1.2 unwahrscheinlich. Somit wurden veränderte Depolarisationsmechanismen als ursächlich in Betracht gezogen. In den folgenden Kapiteln wurden daher Mechanismen untersucht, die als typische Modulatoren des Membranpotentials in VSMC bekannt sind.

3.3.3.1 Einfluss von Natriumionen

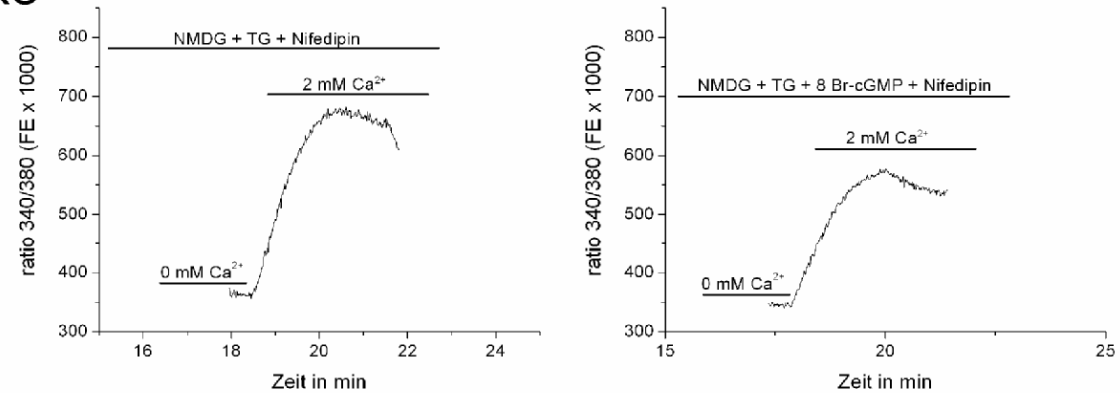
Natrium spielt in zweierlei Hinsicht eine tragende Rolle für die intrazelluläre Calciumkonzentration. Zum einen als Ladungsträger, da ein Einstrom von Natriumionen, über TRPC- und spannungsabhängige Natriumkanäle, zu einer Membrandepolarisation und konsekutiv zum Calciumeinstrom durch Cav1.2 führt. Zum anderen fungiert es als Triebkraft für den Natrium-Calcium-Antiporter. Dieses Membranprotein hält in Ruhe die intrazelluläre Calciumkonzentration niedrig, da es ein Calciumion im Austausch gegen drei Natriumionen aus der Zelle fördert. Dies wird als 'forward mode' bezeichnet. Kommt es zum Beispiel in Folge des SOCE zu einer erhöhten Natriumkonzentration im Bereich der cytosolischen Seite der Plasmamembran, sind diese Antiporter in der Lage in den so genannten 'reverse mode' zu schalten, in dem Natriumionen aus der Zelle transportiert werden, im Austausch gegen Calcium (Poburko et al. 2007). Um den Einfluss von Natrium als mögliche Ursache für die fehlende Hemmbarkeit des SOCE in den KO VSMC zu untersuchen, wurden die Experimente mit 8 Br-cGMP bei Abwesenheit extrazellulären Natriums durchgeführt. Dieses wurde im Tyrodepuffer gegen N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) ersetzt. Dieses ist wie Natrium einfach positiv geladen, gelangt aber aufgrund seiner Größe nicht ins Zellinnere.

Sollte als Ursache der unterschiedlichen Hemmbarkeit, eine direkte oder indirekte Interaktion von IRAG mit dem Natrium-Calcium-Antiporter zugrunde liegen, so sollte sich diese bei Abwesenheit von Natrium und geblocktem spannungsabhängigen Calciumstrom zeigen. Der SOCE der WT Kontrollen betrug unter diesen Bedingungen 363.0 ± 22.6 fe und war mit 1 mM 8 Br-cGMP auf 278.0 ± 14.0 fe vermindert. Diese Hemmung war mit $p = 0,0023$ hochsignifikant. In den KO Kontrollen betrug der SOCE 324.9 ± 27.7 fe. In Gegenwart von 8 Br-cGMP ließ er sich auf 243.7 ± 14.9 fe hochsignifikant vermindern ($p = 0,0087$). Das Ausmaß der Hemmung auf 76.6 ± 3.9 % im WT unterschied sich dabei nicht von dem im KO auf 75.0 ± 4.6 %.

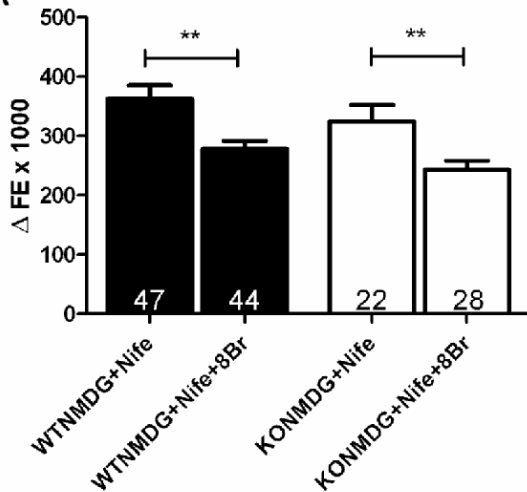
WT



KO



A



B

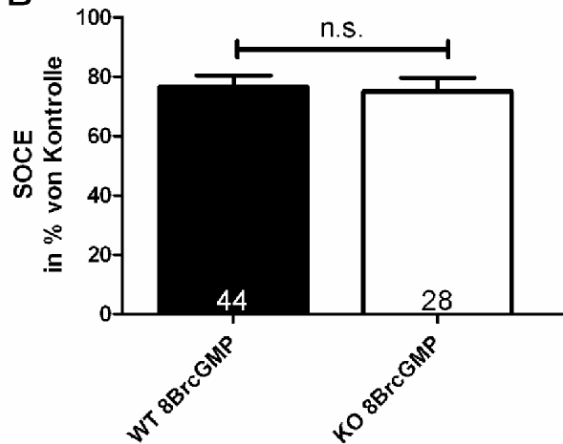
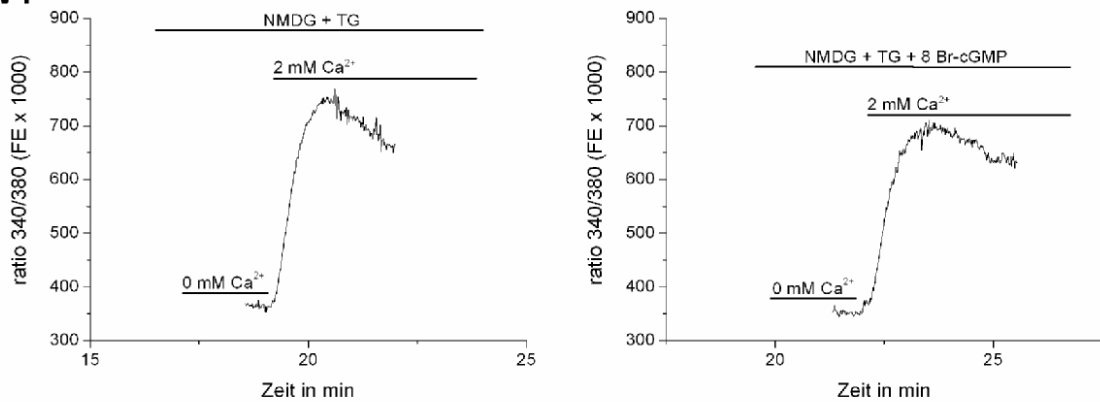


Abbildung 30: Effekt von Natrium auf SOCE

Die Abbildung zeigt den Effekt von 1 mM 8 Br-cGMP auf den SOCE in Gegenwart von 10 μM Nifedipin, bei Abwesenheit extrazellulären Natriums. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE ist auch bei Abwesenheit extrazellulären Natriums sowohl in WT VSMC, wie auch KO VSMC signifikant hemmbar. Ein Unterschied im Ausmaß der Hemmung zwischen beiden Gruppen besteht nicht. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von 8 Br-cGMP in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 4 - 8 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 4 - 8 Mäusen.

Sollte Natrium als Ladungsträger den Unterschied verursachen, so sollte sich dies bei der Bestimmung des SOCE in Abwesenheit von extrazellulärem Natrium und aktivierbarem Cav1.2 bestimmen lassen. Bei Abwesenheit von Natrium und Nifedipin betrug der mittlere SOCE der WT Kontrollen 407.7 ± 24.6 fe, in Gegenwart von 1 mM 8 Br-cGMP 345.6 ± 24.6 fe. Dieser Unterschied war bei einem p-Wert von 0,0775 nicht mehr signifikant. Der SOCE der KO Kontrollen betrug 378.4 ± 19.2 fe und konnte mit 1 mM 8 Br-cGMP ebenso wenig gehemmt werden (355.4 ± 18.00 fe; $p = 0,3898$). Die Kontrollen zwischen WT und KO VSMC waren zudem nicht unterschiedlich.

WT



KO

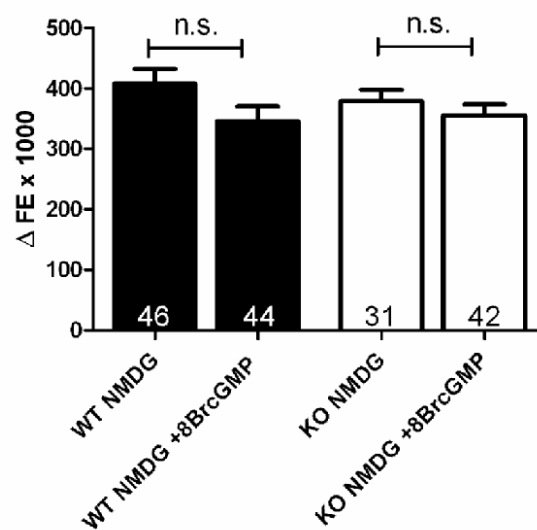
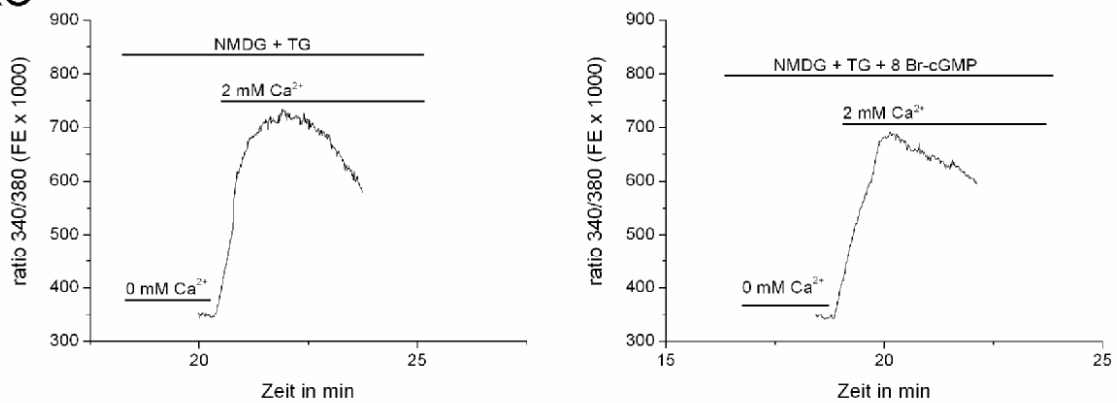


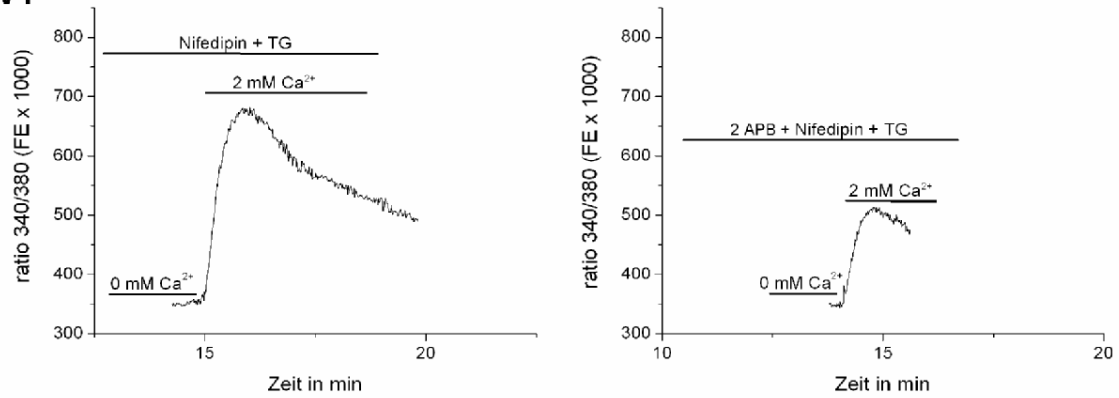
Abbildung 31: Effekt von Natrium auf SOCE inklusive VOCE

Die Abbildung zeigt den Effekt von 8 Br-cGMP auf den SOCE bei Abwesenheit extrazellulären Natriums. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. 1 mM 8 Br-cGMP zeigt bei Abwesenheit extrazellulären Natriums keinen Effekt auf das Ausmaß des SOCE. Das Balkendiagramm gibt die statistische Auswertung der Versuche an. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 4 - 8 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 4 - 8 Mäusen.

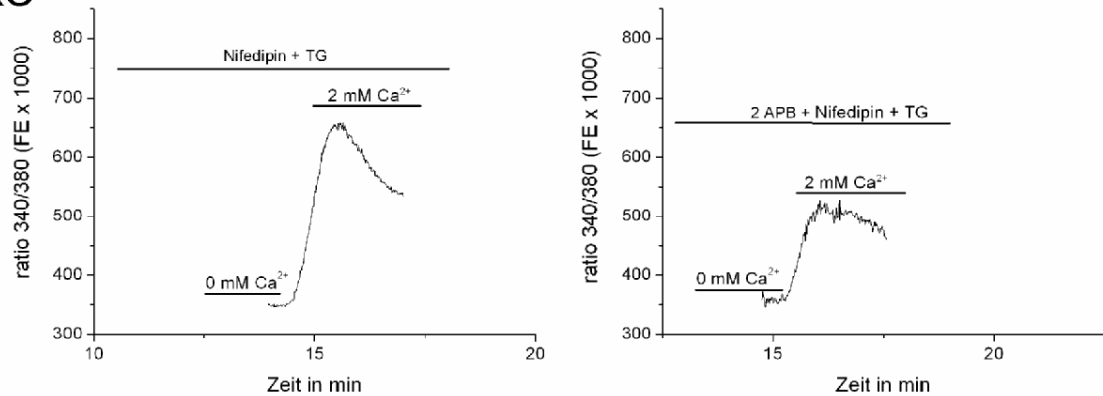
3.3.3.2 SOC Kanäle

Da, wie bereits erwähnt, am SOCE beteiligte Kanäle auch durchlässig für Natriumionen sind, könnte die unterschiedliche Hemmbarkeit des SOCE auf einer unterschiedlichen Expression oder Regulation der daran beteiligten Kanäle liegen. Um generell Unterschiede in der Qualität des SOCE zwischen WT und KO VSMC beurteilen zu können, wurden diese mit dem SOCE Blocker 2 Aminoethoxydiphenyl borat (2 APB) behandelt (Prakriya and Lewis 2001). Dieser wurde in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt. Um Effekte durch spannungsabhängigen Calciumeinstrom zu unterbinden, wurde in Gegenwart von 10 μ M Nifedipin gemessen. Der dabei auftretende SOCE der WT Kontrollen betrug 331.8 ± 20.4 fe und konnte in Gegenwart von 2 APB auf 160.8 ± 23.7 fe erniedrigt werden. Diese Hemmung war mit einem p-Wert < 0.0001 höchstsignifikant. Der SOCE der KO Kontrollen betrug 312.3 ± 22.3 fe und konnte mit 2 APB ebenso höchstsignifikant ($p < 0.0001$) auf 152.9 ± 16.6 fe vermindert werden. Der SOCE konnte in den WT VSMC durch 50 μ M 2 APB auf 48.5 ± 7.1 %, was annähernd der Hemmung auf 49.0 ± 5.3 % in den KO VSMC entsprach. Die WT und KO Kontrollen waren nicht signifikant unterschiedlich.

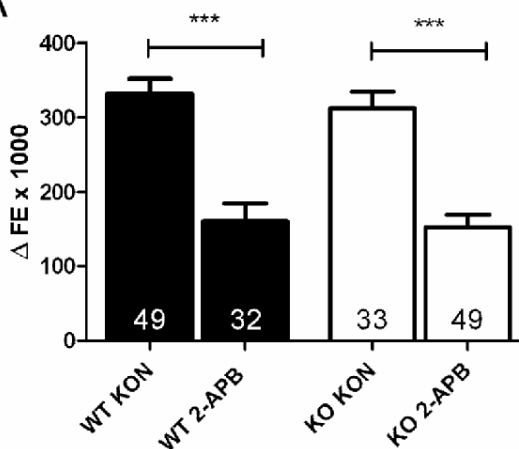
WT



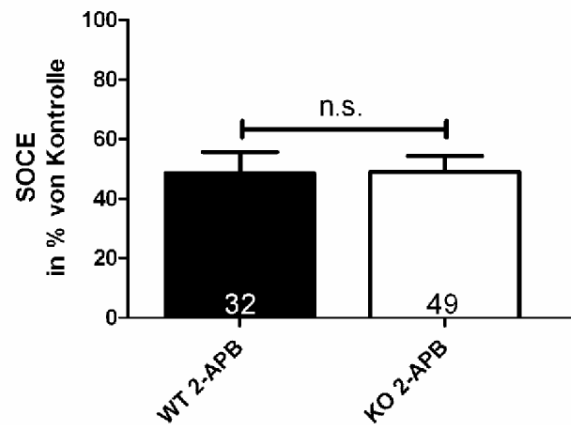
KO



A



B

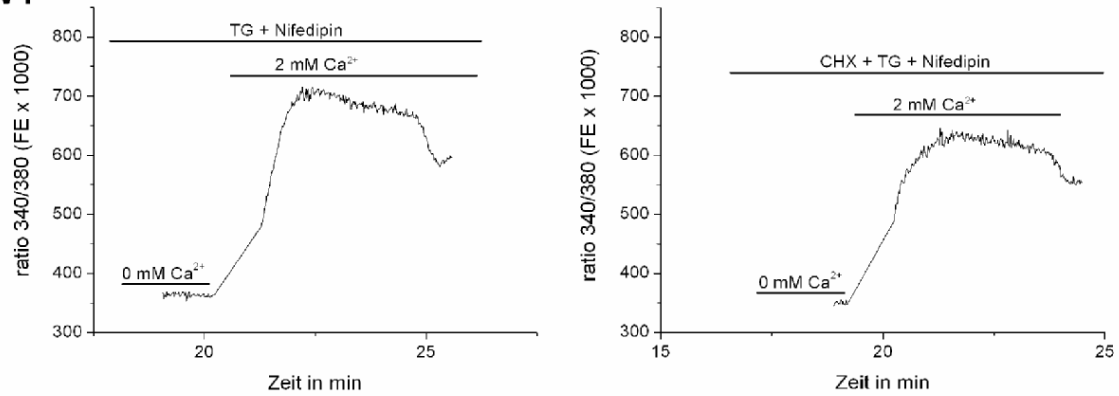
**Abbildung 32: Effekt von 2 APB auf SOCE**

Die Abbildung zeigt den Effekt von 50 μM 2 APB auf den SOCE bei blockiertem Cav1.2. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE ist in beiden Zelllinien höchstsignifikant hemmbar. Ein Unterschied zwischen WT und KO VSMC scheint in den SOCE tragenden Kanälen nicht gegeben. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von 2-APB in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von 4 - 8 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 4 - 8 Mäusen.

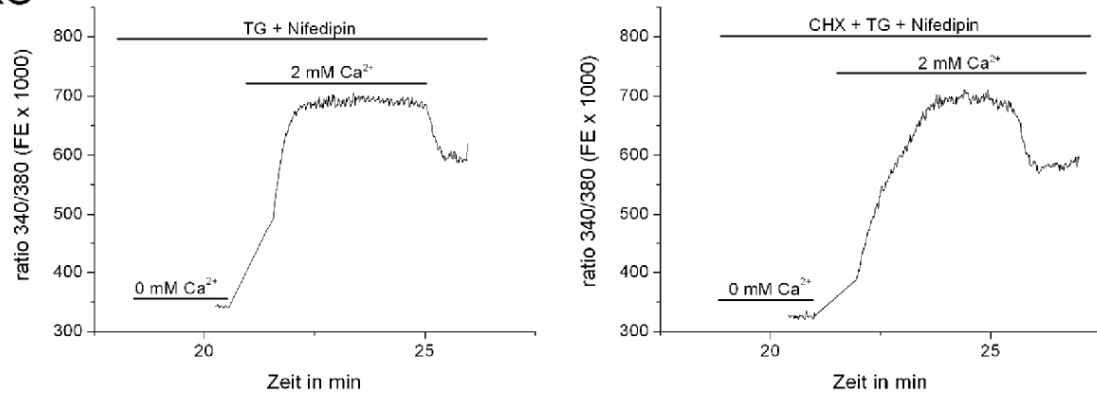
3.3.3.3 Calcium abhängige Kaliumkanäle

Einen weiteren Mechanismus zur Beeinflussung des Membranpotentials stellen Calcium abhängige Kaliumkanäle dar. Diese werden durch ein Ansteigen der intrazellulären Calciumkonzentration spannungsabhängig aktiviert. Die dadurch bedingte erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit führt zu einem erhöhten Ausstrom an Kalium und konsekutiv zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Vor allem dem BK-Kaliumkanal, der sich durch eine hohe Leitfähigkeit auszeichnet, kommt hier eine bedeutende Rolle in der Regulation des Membranpotentials zu (Berridge 2008). Um die Rolle der Kalium induzierten Hyperpolarisation auf den SOCE zu untersuchen, wurden BK-Kanäle mit 500 nM Charybdotoxin (CHX) blockiert. Da CHX als Peptid dazu neigt an Kunststoffoberflächen zu adhären, wurden alle Lösungen in Glasampullen aufbewahrt und durch Zusatz von 1 % BSA stabilisiert. In Gegenwart von Nifedipin konnte hierbei in den WT VSMC eine hochsignifikante Reduktion ($p = 0,0073$) des SOCE erreicht werden. Der SOCE der Kontrollen betrug dabei 355.8 ± 13.7 fe, in Gegenwart von CHX 301.8 ± 14.3 fe. Bei den KO VSMC zeigte CHX keinen signifikanten Effekt ($p = 0,3409$). Die Kontrollen betrugen hier 359.2 ± 18.6 fe, die Gegenwart von CHX bedingte einen SOCE von 384.6 ± 18.8 fe. Der prozentuale SOCE Anstieg der KO VSMC auf $107,1 \pm 5,2$ % unterschied sich bei einem p-Wert von 0.0008 höchstsignifikant von der Hemmung des SOCE der WT VSMC auf $84,8 \pm 4,0$ %. Bei Inkubation ohne Nifedipin zeigte sich weder in den WT, noch in den KO VSMC ein Effekt von CHX (Daten nicht gezeigt).

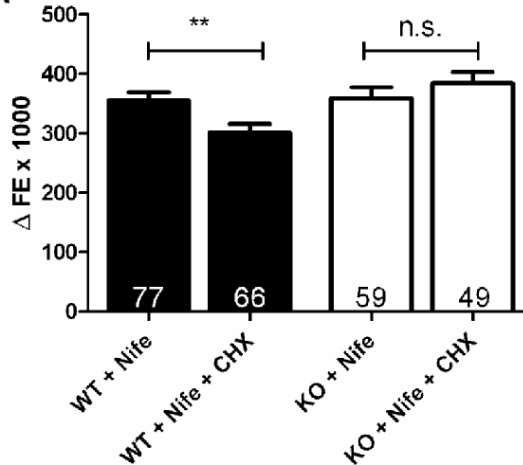
WT



KO



A



B

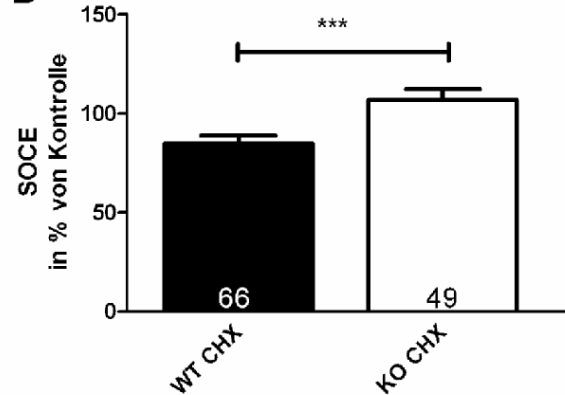


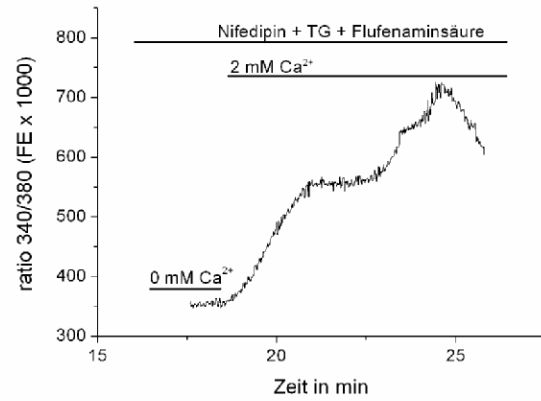
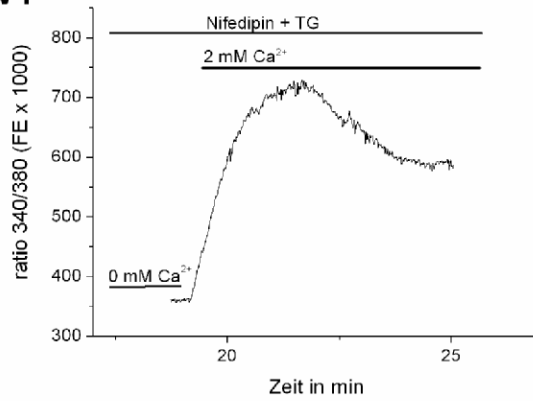
Abbildung 33: Effekt von Charybdotoxin auf SOCE

Die Abbildung zeigt den Effekt von 500 nM CHX auf den SOCE bei blockiertem Cav1.2. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE kann bei blockiertem BK-Kanal nur in den WT VSMC signifikant gehemmt werden, die KO VSMC reagieren mit einer tendenziellen Zunahme. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von Charybdotoxin in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von je 6 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen.

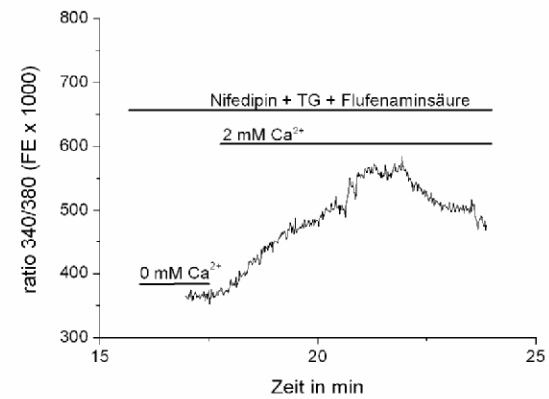
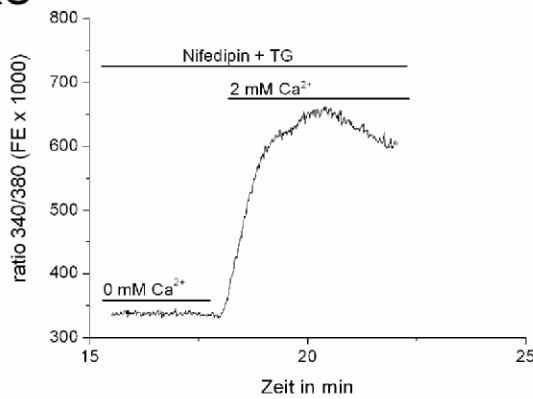
3.3.3.4 Calcium abhängige Chloridkanäle

Eine weitere an der Depolarisation beteiligte Familie von Ionenkanälen sind die Calcium abhängigen Chloridkanäle (ClCa). Diese werden durch intrazelluläre Calciumspiegel über 180 nM aktiviert und tragen durch einen Chloridausstrom zur Depolarisation der VSMC bei (Forrest, Angermann et al. 2010). Das Gleichgewichtspotential von Chlorid in den VSMC liegt bei circa – 25 mV, was zu einer Aktivierung des Cav1.2 führt. Um die Beteiligung dieser Kanäle an der durch das Fehlen von IRAG veränderten Depolarisation zu untersuchen, wurden die VSMC mit den Chloridkanal Blockern Flufenaminsäure und Nifluminsäure behandelt. Die Ergebnisse waren hierbei vergleichbar. Gezeigt sind im Folgenden die Ergebnisse der Behandlung mit 200 µM Flufenaminsäure. Dabei konnte in den WT VSMC in Gegenwart von 10 µM Nifedipin kein Effekt erzielt werden. Der SOCE der WT Kontrollen betrug hierbei 364.3 ± 23.5 fe, unter Einfluss von Flufenaminsäure erhöhte er sich nicht signifikant auf 378.0 ± 46.9 fe ($p = 0,8111$). Die Kontrollen in den VSMC der KO Tiere zeigten einen SOCE von 302.7 ± 21.5 fe der sich in Gegenwart von Flufenaminsäure höchstsignifikant ($p = 0,0004$) auf 216.1 ± 12.7 fe inhibieren ließ. So war auch der Effekt von Flufenaminsäure auf den SOCE zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ($p = 0,0141$). Während im WT eine Erhöhung auf 103.7 ± 12.9 % zu beobachten war, konnte bei den KO VSMC eine Hemmung auf 71.4 ± 4.2 % festgestellt werden.

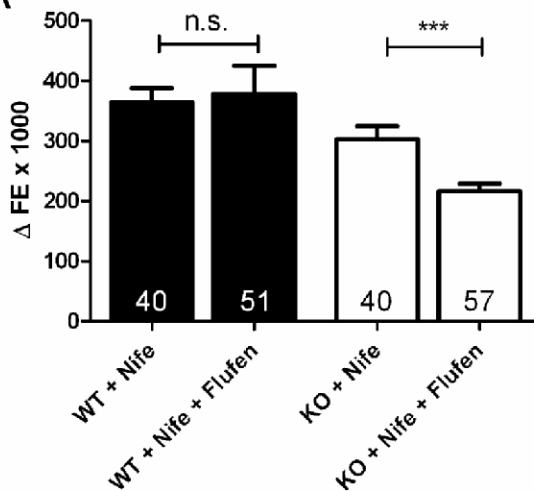
WT



KO



A



B

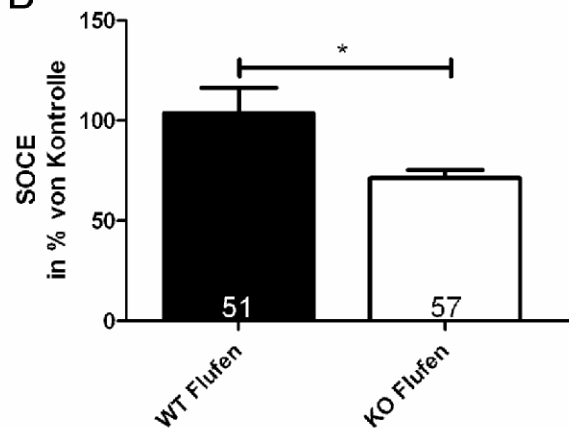
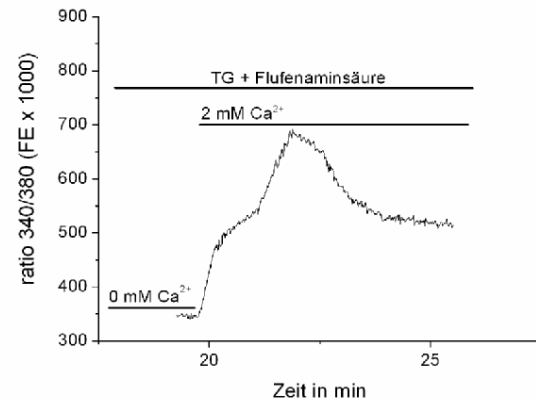
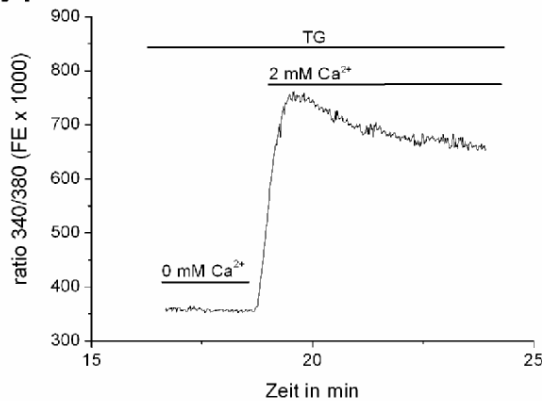


Abbildung 34: Effekt von Flufenaminsäure auf SOCE

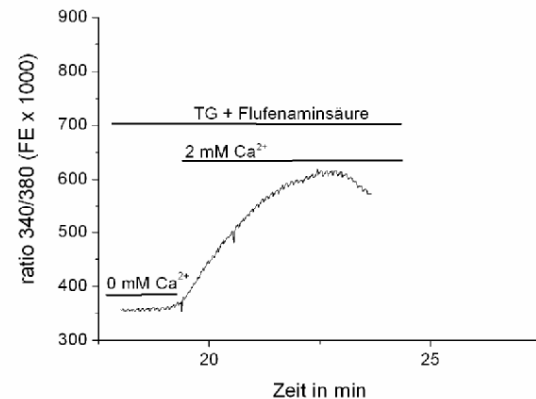
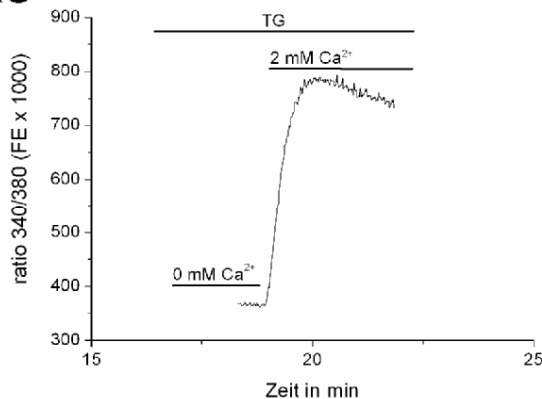
Die Abbildung zeigt den Effekt von 200 μM Flufenaminsäure (Flufen) auf den SOCE bei blockiertem Cav1.2. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE kann bei blockiertem C1Ca in KO VSMC signifikant gehemmt werden, WT VSMC zeigen allerdings keinen Effekt bei Blockade von C1Ca. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von Flufenaminsäure in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von je 5 - 6 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen.

Bei aktivierbarem Cav1.2 konnte in beiden Gruppen eine signifikante Hemmung des SOCE beobachtet werden. In den WT VSMC fand eine Verminderung des SOCE durch Flufenaminsäure auf $61.0 \pm 6.6 \%$ statt, die sich statistisch nicht von der in den KO VSMC beobachteten Hemmung auf $69.6 \pm 6.6 \%$ unterschied. Im Einzelnen war der SOCE in den WT Kontrollen 417.8 ± 19.1 fe und konnte in Gegenwart von Flufenaminsäure auf 254.8 ± 27.4 fe höchstsignifikant ($p < 0.0001$) vermindert werden. Die KO Kontrollen zeigten einen SOCE von 394.1 ± 25.7 fe, die KO VSMC mit Flufenaminsäure zeigten eine hochsignifikante ($p = 0,0014$) Verminderung des SOCE auf 274.5 ± 25.4 fe.

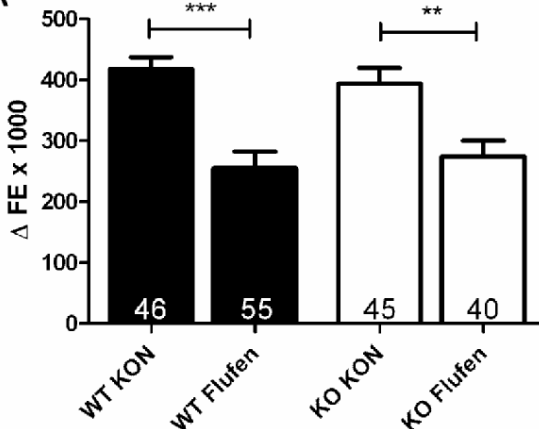
WT



KO



A



B

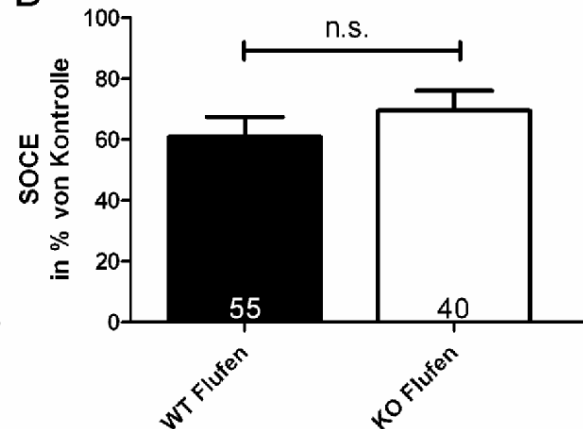


Abbildung 35: Effekt von Flufenaminsäure auf SOCE inklusive VOCE

Die Abbildung zeigt den Effekt von 200 μM auf den SOCE. Die Graphen stellen dabei exemplarische Originaldaten dar. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind durch Striche und zugehörige Beschriftung angezeigt. Der SOCE kann bei aktivierbarem Cav1.2 durch Flufenaminsäure in KO und WT VSMC gleichermaßen signifikant gehemmt werden. Die Balkendiagramme geben die statistische Auswertung der Versuche an. Diagramm A zeigt dabei die absoluten Werte, Diagramm B zeigt das Ausmaß des SOCE in Gegenwart von Flufenaminsäure in Prozent der Kontrollen. Die Zahlen in den Balken geben dabei die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Resultat von je 5 - 6 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen

3.4 Membranpotentialmessungen

Da die KO VSMC im Unterschied zu den WT VSMC in den Versuchen zur Bestimmung der SOCE zum einen ein verändertes Depolarisationsverhalten zeigten, und zudem Unterschiede in der Triebkraft für Kalium und Chlorid offenbarten, war es möglich, dass die KO VSMC beim Auftreten der SOCE ein im Vergleich zu den WT VSMC verändertes Membranpotential aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurde der Verlauf des Membranpotentials mit dem FLIPR Membrane Potential assay kit verfolgt. Die genaue Methodik steht unter 2.8 beschrieben. Nachdem der Farbstoff eingewaschen war, wurde 20 Minuten mit Calciumfreier Tyrode in Gegenwart von 1 μM TG das SR entspeichert. Anschließend wurde die SOCE ausgelöst durch 15 minütiges Einwaschen von calciumhaltiger Tyrode. Der Verlauf und die Auswertung sind in Abbildung 36 zu sehen. Der Abfall des Membranpotentials durch Auswaschen von Calcium betrug in den Kontrollen der WT VSMC $-16,6 \pm 7,0$ fe und unterschied sich damit nicht von den Kontrollen der KO VSMC mit $-15,3 \pm 7,5$ fe. In beiden Zelllinien konnte in Gegenwart von 1 mM 8 Br-cGMP ein höchstsignifikant stärkerer Abfall des Membranpotentials erreicht werden als unter Kontrollbedingungen ohne cGMP. Für die WT VSMC betrug der cGMP bedingte Abfall $-116,2 \pm 11,5$ fe, für die KO VSMC $-115,4 \pm 12,3$ fe. Beim Einwaschen von Calcium kam es zeitverzögert zu einem weiteren Abfall des Membranpotentials, vermutlich aufgrund der Öffnung Calciumabhängiger Kaliumkanäle. Dieser weitere Abfall betrug im Falle der WT Kontrollen $-55,8 \pm 4,8$ fe, respektive $-46,4 \pm 4,8$ fe bei Inkubation mit 8 Br-cGMP. Die entsprechenden Werte für die KO VSMC betrugen $-52,9 \pm 5,2$ fe für die Kontrollen und $-48,9 \pm 3,8$ fe bei cGMP Inkubation. Keine der Gruppen unterschied sich signifikant von einer anderen. Beim Vergleich des Membranpotentials vor Einwaschen von TG und Calcium freier Tyrode konnte in den VSMC aus WT Mäusen ein Wert von $536,7 \pm 22,9$ fe ermittelt werden, der mit einem p-Wert von 0.7247 gleich dem Potential der VSMC der KO Tiere mit $548,2 \pm 23,3$ fe war. Es konnten somit keine signifikanten Unterschiede, weder im Verlauf, noch im Ruhemembranpotential zwischen WT und KO VSMC festgestellt werden.

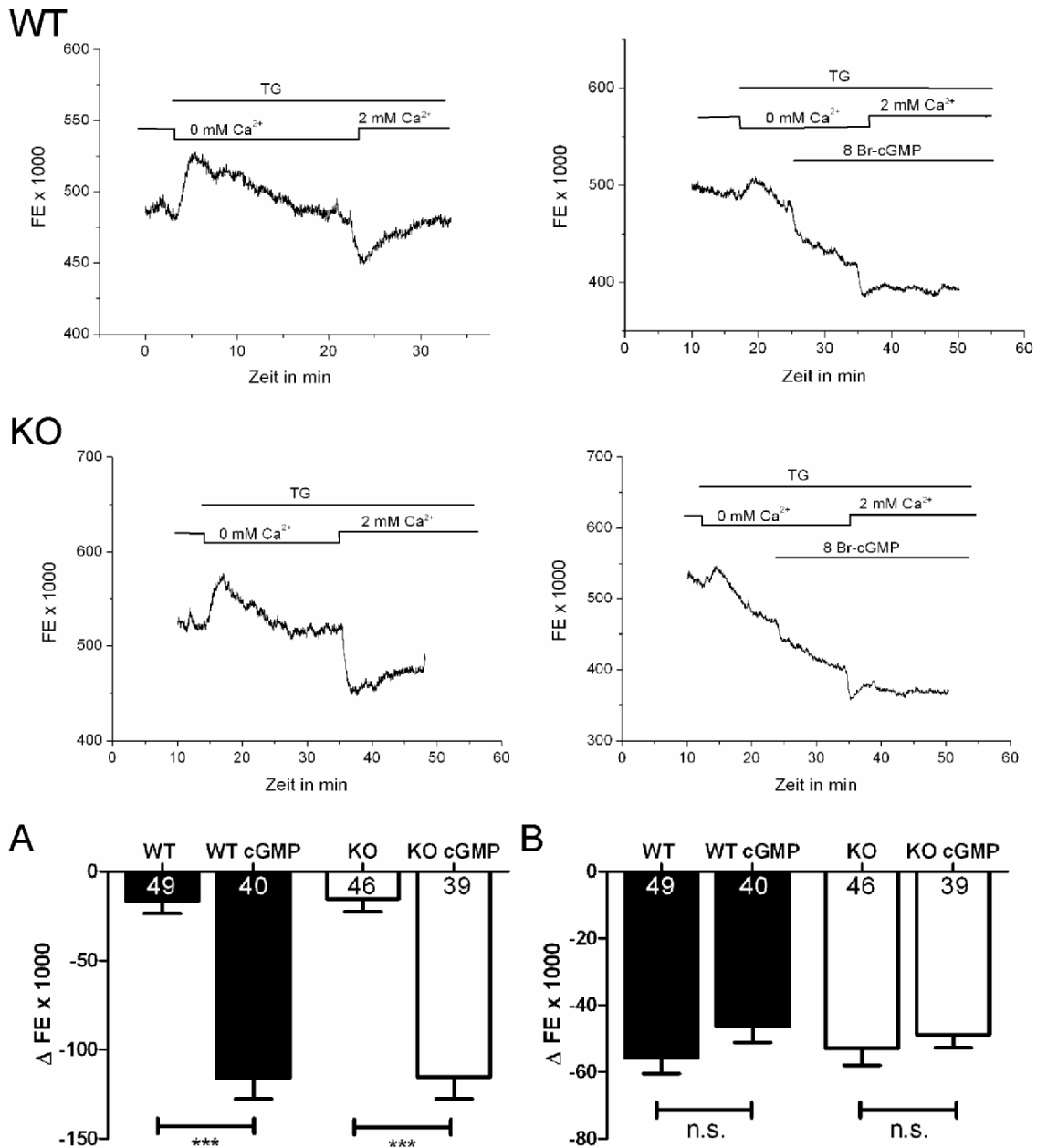


Abbildung 36: Verlauf des Membranpotentials während SOCE

Gezeigt ist der Verlauf des Membranpotentials während des Protokolls zur Auslösung des SOCE. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind in den Originalaufzeichnungen angezeigt. Beim Einwaschen von TG ist zunächst ein Anstieg des Membranpotentials, aufgrund des Anstiegs intrazellulären Calciums, zu beobachten. Im Folgenden kommt es durch das Entfernen extrazellulären Calciums zu einem Abfall des Membranpotentials, der in einem Plateau mündet. Dieser Abfall ist im Vergleich zum initialen Potential in Diagramm A dargestellt. Sowohl in den KO VSMC, wie auch den WT VSMC ist mit 1 mM 8 Br-cGMP ein höchstsignifikanter Abfall des Membranpotentials im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu erkennen. Diagramm B stellt den Verlauf des Membranpotentials beim Auftreten des SOCE durch Einwaschen extrazellulären Calciums dar. Bei beiden Zelllinien kommt es zeitverzögert zu einem weiteren Abfall des Membranpotentials. Ausgewertet wurde hier die Differenz aus der Plateauphase und dem Minimum des Abfalls. Statistische Unterschiede lassen sich hier zwischen den einzelnen Gruppen nicht feststellen. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der vermessenen Zellen an. Diese sind das Ergebnis von 7 – 9 individuellen Messungen, mit Zellen aus je 8 Mäusen.

4. Diskussion

4.1 Expression von Proteinen des trimeren Komplexes

Bei der Expressionsanalyse der IP₃-Rezeptor Isoformen in verschiedenen glattmuskulären Organen wurde im Vergleich zu WT Tieren eine Hochregulation von IP₃R2 im Magen der KO Tiere festgestellt. Ebenso war eine verminderte Expression von IP₃R3 im Jejunum der KO Tiere zu beobachten. Die Expression von IP₃R1 war in allen untersuchten Organen unverändert. Über die Funktion von IP₃R2 im Magen liegen bislang keine Berichte vor. Allerdings legen einige Befunde eine Bedeutung für die Sekretion und Verdauung nahe. So ist zum Beispiel für die Epithelien des Rattencolons ein Vorkommen von IP₃R2 und 3 berichtet, nicht aber von IP₃R1 (Siefjediers et al. 2007). Zudem konnte in primären glatten Muskelzellen aus Kaninchenmägen kein IP₃R2 nachgewiesen werden (Murthy and Zhou 2003). Da in den Mägen der von uns untersuchten Mäuse IP₃R2 nachgewiesen wurde, liegt der Schluss nahe, dass dieses Signal aus den Epithel- und/oder Drüsenzellen des Magens stammt. Zudem wurde in exkretorischen Zellen der Speicheldrüse und in Hepatozyten eine Übereinstimmung der Lokalisation von IP₃R2 und den zur Sekretion führenden Calciumwellen gezeigt (Yamamoto-Hino et al. 1998; Hirata et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Mikoshiba konnte zudem ein Vorkommen von IP₃R2 und 3 in den Acini des Pankreas und der Speicheldrüse nachweisen. Doppel KO Mäuse wiesen eine verminderte Speichelsekretion, sowie eine verminderte Sekretion von Verdauungssäften infolge gestörter Calciumfreisetzung auf (Futatsugi et al. 2005).

Des Weiteren wurde bei den IRAG Δ 12-Tieren eine verlängerte Magen-Darm-Passage festgestellt (Geiselhoringer, Werner et al. 2004b). Bei den IRAG KO Mäusen wurde dies zwar noch nicht untersucht, aber bei beiden Linien dilatierten mit zunehmendem Alter Oesophagus, Magen und Caecum stark (Desch, Sigl et al. 2010). Eine Durchtrennung des Oesophagus der KO Tiere zeigte starken Reflux (persönliches Gespräch mit Dr. Desch). Somit lässt sich eine Beteiligung an der Prepepsin- oder Magensäuresekretion von IP₃R2 in Betracht ziehen. Zudem wurde vor kurzem in Cos-Zellen eine Interaktion von IRAG auch mit IP₃R2 und 3 gezeigt. Eine Phosphorylierung von IRAG führte dabei, in Analogie zur Isoform 1, zu einer verminderten Calciumfreisetzung (Masuda, Betzenhauser et al. 2010). Inwieweit sich diese Ergebnisse auf in vivo Daten übertragen lassen bleibt fraglich, sind aber ein Hinweis auf eine Beteiligung von IRAG an der Sekretion und Verdauung über die Interaktion mit IP₃R2. Ob die Hochregulation von IP₃R2, infolge der IRAG Deletion, hierbei ursächlich oder kompensatorisch ist bleibt zu klären.

Die beobachtete Hochregulation von cGK1 α im Magen als einzigem der untersuchten Gewebe ist bemerkenswert. Sie hängt aber nicht zwingend mit der IP₃R2 Regulation zusammen, da die IP₃R, mit Ausnahme der Isoform 1, keine identifizierten Substrate der

cGK1 darstellen. So sind verschiedene Phosphorylierungsstellen durch PKA beschrieben, für eine Phosphorylierung durch cG-Kinasen liegen bis dato aber keine Beweise vor (Bezprozvanny 2005; Masuda, Betzenhauser et al. 2010).

In WT Tieren war IP₃R3 die einzige im Jejunum detektierbare Isoform der IP₃R. Dies ist im Einklang mit bisherigen Berichten. So werden GIT und Thymus, als die Organe mit der höchsten Expression an IP₃R3 beschrieben (De Smedt et al. 1994). Zudem konnten (Frei et al. 2009) eine untergeordnete Bedeutung der IP₃R vermittelten Glattmuskelkontraktion im Jejunum nachweisen, was die nicht detektierbare Expression von IP₃R1 erklärt. Über die Funktion von IP₃R3 im Jejunum ist allerdings bislang nichts bekannt. So lässt sich auch über die verminderte Expression in den KO Tieren nur spekulieren. Allerdings liefert dies einen Hinweis für eine Interaktion von IRAG auch mit IP₃R3, wie von (Masuda, Betzenhauser et al. 2010) in vitro gezeigt wurde.

Ebenso konnte eine verminderte Expression der cGK1 β in allen untersuchten Geweben festgestellt werden. Dies ist in Analogie zu den Arbeiten von Geiselhöringer und Kollegen, die dies auch in den Geweben der IRAG Δ 12 Tiere sahen. Eine Hochregulation von cGK1 α wie bei den IRAG Δ 12 Tieren konnte, mit der bereits erwähnten Ausnahme im Magen, für die hier untersuchten KO Tiere nicht festgestellt werden. Für alle glattmuskulären Organe wurde bereits gezeigt, dass cGK1 β die vorherrschende Variante der cGK1 ist (Geiselhöringer, Gaisa et al. 2004a). Vor allem bei Colon und Blase ist diese unterschiedliche Expression sehr ausgeprägt. Dadurch erklärt sich die zum Teil deutliche Reduktion des cGK1c Signals. Die geringere Expression von cGK1 β gibt allerdings auch berechtigten Grund zu der Annahme, dass die beobachteten Effekte der veränderten Relaxation und Calciumfreisetzung auf der verminderten Expression der Kinase beruhen. Dies ist allerdings nicht der Fall. So konnten Desch und Kollegen zeigen, dass IRAG KO Tiere, in denen unter dem glattmuskelspezifischen Promotor SM 22 cGK1 β überexprimiert wurde (Weber, Bernhard et al. 2007), den gleichen Gehalt an cGK1 β aufweisen wie ihre WT Geschwister. Diese Tiere zeigen aber in ähnlichem Ausmaß wie die reinen IRAG KO Tiere eine signifikant verminderte Relaxation bei 8 Br-cGMP Gabe (Desch, Sigl et al. 2010).

4.2 Lokalisation von Proteinen des trimeren Komplex

Des Weiteren wurde der trimere Komplex erstmals in VSMC dargestellt. So konnte die Kolokalisation von IRAG mit IP₃R1 und cGK1 β nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit cGK1 α war nicht zu beobachten. Dies ist in Analogie mit bisherigen Erkenntnissen (Schlossmann, Ammendola et al. 2000). Bei der differenzierten Betrachtung der intrazellulären Lokalisation von cGK1 α mit cGK1 β fällt die stark unterschiedliche Verteilung der Kinasen auf. Dabei ist cGK1 β offenbar die vorherrschende Variante in den

VSMC, sie zeigte Kollokalisierungen mit allen der untersuchten Zellmarker. Im Gegensatz dazu war die Lokalisation von cGK1 α auf die Zisternen des Golgi Apparates beschränkt. Es gilt als allgemein anerkannt, dass sich bei der Kultur primärer VSMC bereits nach wenigen Tagen ein veränderter Phänotyp einstellt (Chamley-Campbell et al. 1981). Die Befähigung zur Veränderung von einem kontraktilen, hin zu einem proliferativen, migratorischen Phänotyp, ist in vivo eine wichtige Eigenschaft der VSMC zum Erhalt der Gefäßintegrität bei Verletzungen und spielt eine entscheidende Rolle für die Angiogenese (Hoofnagle et al. 2006; Lincoln et al. 2006). Neben einer verminderten Expression typischer kontraktiler Proteine, wie der schweren Kette des Myosins, 'smooth muscle' α -Aktin oder auch Calponin (Wamhoff et al. 2006), wurde im Zusammenhang mit der phänotypischen Veränderung auch eine verminderte Expression von cGK1 α in proliferativen VSMC nachgewiesen (Zhang, Zhuang et al. 2007). Möglicherweise ist daher die Bergrenzung der Lokalisation von cGK1 α auf die Zisternen des Golgi Apparates das Resultat eines veränderten Phänotyps. Aufgrund der starken Zunahme der Fluoreszenzintensität in den hier untersuchten VSMC bei den Färbungen mit phosphospezifischen Antikörpern bei Stimulation mit 8 Br-cGMP kann aber von einem nach wie vor funktionalen und aussagekräftigen System ausgegangen werden.

Beide Varianten der cGK1 sind cytosolisch und ihre Aktivität und Position innerhalb der Zelle sind durch die Bindung ihrer Leucin-Zipper-Domäne an Substratproteine bestimmt. Durch die Deletion von IRAG als spezifischem Substrat der cGK1 β am SR wäre eine Umverteilung der Kinase in den KO VSMC denkbar. Eine veränderte Lokalisation von cGK1 β war allerdings nicht zu beobachten, weder mit noch ohne cGMP Inkubation. Die Kollokalisierungen von cGK1 β in sowohl WT wie auch KO VSMC, mit allen gefärbten Zellmarkern, implizieren die Positionierung von cGK1 β über die Interaktion mit weiteren Proteinen. So wurden im Laufe der letzten Jahre mehrere Substrate der cGK1 in VSMC beschrieben, die allesamt zur Lokalisation der Kinase beitragen können. So wurde beispielsweise das cytosolisch an Aktin gebundene CRP4 als cGK Anker Protein (GKAP) beschrieben (Zhang, Zhuang et al. 2007). Zudem kann cGK1 über die Interaktion mit dem SR assoziiertem Protein Phospholamban, am SR positioniert werden (Lalli, Shimizu et al. 1999; Koller, Schlossmann et al. 2003). Eine cGMP abhängige Translokation von cGK1 β in den Kern, bei IRAG Defizienz, wie von (Casteel, Zhang et al. 2008) in transfizierten BHK Zellen beschrieben, wurde ebenso wenig beobachtet. Diese Translokation von cGK1 β in den Kern und die Retention durch IRAG wurde auch von unserer Arbeitsgruppe beobachtet (Desch, Sigl et al. 2010). Allerdings wurden diese Experimente an transfizierten Cos Zellen durchgeführt. Weder Cos Zellen, noch BHK Zellen exprimieren nativ cGK1 oder IRAG, so dass aller Wahrscheinlichkeit nach auch weitere zur Verankerung der Kinase im Cytosol wichtige Substrate fehlen. Zum anderen wurden die

Proteine überexprimiert, so dass die Kapazitäten vorhandener Bindungspartner nicht ausreichen, um die Kinase im Cytosol zu verankern. Zusammenfassend kommt der Rolle von IRAG zur Verankerung von cGK1 β am SR, bei physiologischer Konzentration der beiden Proteine in VSMC, offensichtlich eine untergeordnete Bedeutung zu.

Ob und zu welchen Bedingungen darüber hinaus die cG-Kinasen in VSMC überhaupt in den Kern wandern, bleibt zu klären. Die Translokation der Kinase in den Kern der VSMC dürfte durch die Kernmembran hinreichend erschwert sein. Mit 76 - 78 kDa ist cGK1 zu groß für eine ungehinderte Diffusion durch die Kernporen. Es gibt allerdings Berichte, wonach cG-Kinasen eine nukleäre Lokalisationssequenz aufweisen (Gudi et al. 2000). Mit dieser wäre eine Kopplung an nukleäre Transporter und aktive Aufnahme in den Kern möglich (Gorlich and Mattaj 1996). Eine andere Arbeit die sich mit der Translokation der cG-Kinasen in den Kern beschäftigte, postulierte eine proteolytische Spaltung der cGK1 α im Golgi-Apparat von transfizierten RFL 6 Zellen. Durch das Fehlen der N-terminalen autoregulativen Domäne entstand ein konstitutiv aktives Fragment von 60 kDa, welches in den Kern diffundieren konnte (Sugiura, Nakanishi et al. 2008). Dies wäre ein Mechanismus, wie er für die Proteinkinase A zum Beispiel seit langem bekannt und erforscht ist (Hagiwara et al. 1993). In dieser Arbeit von Sugiura und Kollegen wurde aber auch festgestellt, dass das cG-Kinase Fragment in primären VSMC der Ratte zum Teil unabhängig von cGMP Stimulation im Kern detektiert werden konnte und die Kernlokalisierung von der Passage und der Dichte der Zellen abhing und innerhalb einer Population starken Schwankungen unterlag. Zudem konnten die Autoren in der glattmuskulären Zelllinie A7r5 keine Kernlokalisierung beobachten. So liegen auch Arbeiten über murine VSMC vor, die ebenso wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, keine Kerntranslokation sehen (Collins and Uhler 1999; Browning et al. 2001; Feil et al. 2002). Andere Autoren wiederum, hier in Osteoblasten gezeigt, berichten von einer Kerntranslokation der Kinase (Broderick et al. 2007). Der Einfluss von cGMP auf die Genexpression und den Phänotyp von VSMC ist ein etablierter Mechanismus und wird von mehreren Autoren beschrieben (Pilz and Broderick 2005; Lincoln, Wu et al. 2006). So liegen auch zahlreiche Arbeiten vor, die cGK1 als Effektorprotein hierfür sehen (Lincoln et al. 2001; Sauzeau et al. 2003) und dabei eine besondere Rolle der cGK1 α aufzeigten (Zhang, Zhuang et al. 2007; Sugiura, Nakanishi et al. 2008). Ob aber für die Effekte von cGK1 auf die Genexpression eine Lokalisation im Kern nötig ist, wie sie vor allem in transfizierten Systemen immer wieder postuliert wird, oder die Regulation über die Phosphorylierung von kerngängigen Substraten erfolgt, ist nicht eindeutig. So scheint eine Translokation in den Kern durchaus plausibel, unterliegt aber in nativen VSMC offensichtlich auch einer bislang unbekannten Regulation.

Auch bei Betrachtung der Lokalisation der cGK1 α konnte keine Rolle der IRAG Expression festgestellt werden. Zum einen liegen die Proteine in unterschiedlichen Zellkompartimenten, zum anderen hat das Entfernen von IRAG keine Wirkung auf die Position der Kinase. Über die Bedeutung von cGK1 α im Golgi Apparat kann allerdings nur spekuliert werden. Für eine proteolytische Spaltung wie sie in (Sugiura, Nakanishi et al. 2008) beschrieben wurde und vor dem Hintergrund einer möglichen phänotypischen Herabregulation plausibel erscheint, konnten keine Hinweise gefunden werden, da der N-terminale Bereich und die 'common' Domäne in den untersuchten cGK1 α rescue Tieren gleich verteilt vorlagen. So war auch mit cGK1c Antikörper keine Kernfärbung zu beobachten.

Die Verteilung von IP₃R1 im Cytosol ist zum einen im Einklang mit anderen Autoren (Tasker et al. 2000; Morel, Fritz et al. 2003; Diaz-Munoz et al. 2008), spiegelt aber auch die Komplexität der Koordination der räumlichen und zeitlichen Calciumregulation wieder. So wurde gezeigt, dass zur Muskelkontraktion benötigtes Calcium vorwiegend aus den tiefen, kernnahen Kompartimenten des SR durch IP₃R1 freigesetzt wird (Lee et al. 2002; Wilson et al. 2002), wohingegen Calciumfreisetzung aus dem SR in Plasmamembrannähe meist in örtlich begrenzten Domänen zur Steuerung von Membranproteinen, wie z.B. dem BK-Kaliumkanal, Calciumabhängigen Chloridkanälen oder Natrium-Calcium-Austauschern dient (Young and Zhang 2004; Zhao et al. 2010). Durch diese Mechanismen besteht ein direkter Einfluss auf das Membranpotential und damit der Erregbarkeit der VSMC. Zudem berichten auch andere Autoren von den nukleären Verästelungen ('nuclear branchings') der IP₃R (Huh et al. 2007) und von IP₃R vermittelten Calciumsignalen in den Kern (Kusnier et al. 2006; Diaz-Munoz, de la Rosa Santander et al. 2008; Chen et al. 2009). Interessanterweise war das Ausmaß der Koloalisation zwischen IRAG und IP₃R1 in den tiefen, kernnahen SR-Kompartimenten der VSMC, also dem Ursprung der kontraktile Calciumsignale, am höchsten. Eine Hemmung der nukleären IP₃R1 vermittelten Calciumfreisetzung durch IRAG ist aufgrund des Fehlens von IRAG im Kern eher unwahrscheinlich. Diese Befunde bestätigen die Funktion von IRAG als Instrument zur Relaxierung glatter Muskelzellen und als Mittel zur Feinregulation von Calciumsignalen innerhalb der Zelle. Eine Funktion von IRAG für die Lokalisation von IP₃R1 kann aufgrund der fehlenden Umverteilung des Rezeptors in den IRAG KO VSMC ausgeschlossen werden.

4.3 Calciumregulation in VSMC durch IRAG

4.3.1 Hormonvermittelte Calciumfreisetzung

Durch Experimente an IRAG Δ 12 Mäusen konnte bereits die Bedeutung von IRAG für die Calcium abhängige Relaxierung von glattmuskulären Geweben nach Hormonstimulation

gezeigt werden. So war bei Kraftmessungen an Geweben von Aorta und Colon die Relaxierung durch 8 Br-cGMP nach Hormon vermittelter Kontraktion signifikant geringer als in Geweben aus WT Tieren. Bei der cAMP abhängigen Relaxierung hingegen zeigten sich keine Unterschiede. Auch die cGMP abhängige Relaxierung nach Kaliumdepolarisation war in Geweben aus sowohl $\Delta 12$, wie auch WT Tieren zu beobachten. In VSMC aus $\Delta 12$ Mäusen konnte zudem die bei WT VSMC durch 8 Br-cGMP verursachte Inhibierung der Calciumfreisetzung nach adrenerger Stimulation nicht beobachtet werden. cAMP blieb bei beiden Zelllinien ohne Effekt auf die hormonell erhöhten Calciumspiegel. Die cGMP abhängige Senkung der durch Kaliumdepolarisation erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration konnte in beiden Zelllinien beobachtet werden (Geiselhöringer, Werner et al. 2004b). Da die IRAG $\Delta 12$ Tiere aber noch immer ein verkürztes IRAG Protein exprimieren, verursacht dieses eventuell unspezifische Effekte. Durch Deletion von Exon 12 ist lediglich die coiled coil Bindedomäne für den IP_3R1 zerstört, so dass zwar die cGMP abhängige Inhibierung der Calciumfreisetzung nicht mehr vermittelt wird, IRAG aber immer noch für anderweitige Effekte zur Verfügung steht. So vermag die IRAG-Mutante z.B. nach wie vor cGK1 β zu binden, die damit anderen zellulären Funktionen entzogen würde. Ob die beobachteten Effekte auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration tatsächlich allein an der fehlenden Inhibierung des IP_3R1 durch IRAG liegen, oder eventuell durch spezifische wie unspezifische Funktionen des mutierten IRAG zustande kommen, sollte anhand der Charakterisierung der IRAG KO Maus untersucht werden. Zudem sollte ein tieferer Einblick in die Bedeutung von IRAG für die Calciumregulation glatter Muskelzellen gewonnen werden. So wurde zunächst die Validität der Calciummessungen verifiziert. Ebenso wie bei den in dieser Arbeit vermessenen WT VSMC konnte sowohl in den WT Kontrollen der IRAG $\Delta 12$ Maus wie auch in den WT Kontrollen der bereits vermessenen KO Tiere (Material aus der Dissertation von Frau Angela Jochim) eine signifikante Inhibierung der Hormon vermittelten Calciumfreisetzung mit 8 Br-cGMP um ca. 30 % beobachtet werden. Diese Inhibierbarkeit war weder bei den $\Delta 12$ VSMC, noch den KO VSMC mehr gegeben. Interessant ist hierbei, dass sowohl von Frau Jochim, wie auch hier bei den KO VSMC eine tendenzielle, also nicht signifikante, Steigerung der Calciumfreisetzung in Gegenwart von 8 Br-cGMP beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wurde auch bei der Generierung endogenen cGMPs über die partikuläre Guanylatzyklase beobachtet. Möglicherweise spielt hier eine Phosphorylierung des IP_3R1 durch cGK1 β eine Rolle. So konnten Wagner und Kollegen in vitro eine Phosphorylierung von IP_3R1 durch cGK1 beobachten, die in erhöhter Calciumfreisetzung resultierte (Wagner et al. 2003). Dieser Effekt ist zwar nur für die S2+ Splice Variante des IP_3R1 beschrieben, die hauptsächlich im Gehirn vorkommt, konnte jedoch, in der vorliegenden Arbeit, auch in peripheren Geweben gezeigt werden.

So wurde bei der Überprüfung der cG-Kinase Aktivität in den VSMC eine Phosphorylierung des IP₃R1 durch cGK1 nachgewiesen. Diese Phosphorylierung des IP₃R1 wurde zudem in murinen glattmuskulären Geweben und Thrombozyten nachgewiesen (persönliches Gespräch mit Frau Katharina Salb). Die tendenzielle Zunahme der Calciumfreisetzung in den VSMC aus KO Tieren könnte somit von einer gesteigerten Calciumfreisetzung durch IP₃R1 herrühren. In den WT VSMC würde dieser Effekt durch die IRAG vermittelte Inhibierung überlagert. Eine Ausnahme von dieser Beobachtung stellen die Ergebnisse im Zusammenhang mit den DEA-NO Experimenten dar. So lässt sich in WT VSMC zwar eine signifikante Hemmung der Calciumfreisetzung erreichen, allerdings fällt diese deutlich geringer aus und ist tendenziell auch in KO VSMC zu beobachten. Dieser Effekt wurde von Desch und Kollegen auch bei der Relaxierung von mit Phenylephrin vorkontrahierten Aorten mit NO Analoga festgestellt. Interessanterweise aber wurden mit Acetylcholin und konsekutiv endogen gebildetem NO aus den Endothelien der Aorta wiederum vergleichbare Ergebnisse erzielt wie bei Verwendung von 8 Br-cGMP oder ANP (Desch, Sigl et al. 2010). Offensichtlich ist die Quelle des NO Angebotes von entscheidender Bedeutung. So wurden zum Beispiel in Myozyten der Ratte Unterschiede in der cGMP Bildung bei Gabe von ANP oder synthetischen NO Analoga beobachtet. Bei Gabe von ANP stellte sich ein positiver Feedback auf die cGMP-Spiegel ein, bei Gabe von NO-Analoga ein negativer (Castro et al. 2010). Dies wurde erklärt über die Bildung von cGMP in lokal unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Möglicherweise fördern NO-Analoga die negative Rückkopplung, während natives NO die positive Rückkopplung begünstigt. Letzten Endes wird aber auch durch die Versuche mit DEA-NO die Bedeutung von IRAG für die cGMP abhängige Reduktion der Hormon vermittelten Calciumfreisetzung bestätigt. Somit wurden die Erkenntnisse aus den Versuchen an IRAG Δ 12 Tieren bezüglich der 8 Br-cGMP abhängigen Wirkungen auf glattmuskuläre Organe bestätigt und eindeutig dem Fehlen von IRAG zugeschrieben. Überdies wurde erstmals auch die Bedeutung von IRAG bei der nativen Aktivierung des cGK1 Signalweges durch Generierung endogenen cGMPs durch Stimulation der sowohl partikulären, wie auch löslichen Guanylatzyklase gezeigt.

4.3.2 Spannungsabhängiger Calciumeinstrom

Zudem wurde bestätigt, dass IRAG keinen Einfluss auf den durch Kaliumdepolarisation verursachten Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle (Cav1.2) hat. So wurde weder ein Effekt auf den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet, noch war ein Unterschied bei der Gabe von 8 Br-cGMP festzustellen. Interessanterweise wurde aber weder in den WT noch den KO VSMC eine Reduktion des Calciumsignals mit 8 Br-cGMP detektiert. Dies wurde auch von (Fellner and Arendshorst 2009) bei Calciummessungen an afferenten Arteriolen und VSMC der Niere beobachtet. 8

Br-cGMP Gabe blieb hier ohne Effekt auf den durch Kaliumdepolarisation verursachten Calciumeinstrom. So liegen aber auch Berichte vor, die eine Inhibierung von CaV1.2 durch 8 Br-cGMP feststellten. So konnte zum einen CaV1.2 als Substrat der cGK1 etabliert werden. Dieser wird zumindest in vitro durch cGK1 an den Untereinheiten $\alpha 1c$ und $\beta 2$ phosphoryliert (Yang et al. 2007). Ebenso war bei den Messungen an VSMC aus IRAG $\Delta 12$ und WT Tieren eine signifikante Reduktion der durch Kaliumdepolarisation erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration gegeben (Geiselhoring, Werner et al. 2004b). So wurde aber auch die Abhängigkeit der 8 Br-cGMP vermittelten Effekte in primären VSMC von dem zur Kultur verwendeten Medium beobachtet (Daten aus Dissertation von Rene Wörner). Dieser Effekt ist wahrscheinlich einer unterschiedlichen Veränderung des Phänotyps der VSMC während der Kultur zuzuordnen. Neben den bereits unter 4.1 beschriebenen Veränderung ist der synthetische, proliferative Phänotyp der VSMC gekennzeichnet durch eine veränderte Calciumhomöostase. Proliferative VSMC zeichnen sich durch erhöhte basale Calciumspiegel und einer veränderten Gewichtung der Calciumsignalwege aus. Während bei kontraktile VSMC der spannungsabhängige Calciumeinstrom eine bedeutende Rolle spielt, wird dieser offensichtlich in proliferativen VSMC supprimiert (House, Potier et al. 2008). So wird unter anderem von einer verminderten Expression spannungsabhängiger Calciumkanäle berichtet (Quignard et al. 2001). Zudem konnten (Tiwari et al. 2006) im Zuge der atherosklerotischen Dedifferenzierung von VSMC eine veränderte Expression der $\alpha 1c$ -Untereinheit des CaV1.2 beobachten. Diese beruhte auf dem Austausch von Exon 21 gegen Exon 22 und resultierte in einer Aktivierbarkeit bei negativeren Membranpotentialen. Da eine der von Yang und Kollegen beschriebenen Phosphorylierungsstellen der cGK1 für eben diese Untereinheit beschrieben ist, könnte diese in der Splice Variante entfallen und die verminderte Hemmbarkeit erklären. Ein Effekt von IRAG auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom konnte aber nach wie vor nicht etabliert werden.

Es gilt als allgemein anerkannt, dass in proliferativen VSMC der Calciumeinstrom über SOCE Kanäle zunimmt, während der spannungsabhängige Calciumeinstrom an Bedeutung verliert (Berra-Romani, Mazzocco-Spezia et al. 2008; House, Potier et al. 2008; Munoz, Valero et al. 2011). Betrachtet man dies vor dem Hintergrund, dass bei unseren Experimenten der SOCE das circa dreifache des spannungsabhängigen Calciumeinstroms betrug, ist dies ein weiterer Hinweis auf den proliferativen Phänotyp der VSMC.

4.3.3 SOCE

Darüber hinaus konnte ein Einfluss von IRAG auf den SOCE etabliert werden. Bei der Inkubation von WT VSMC wurde eine signifikante Verminderung des SOCE in Gegenwart von 8 Br-cGMP festgestellt. Diese war bei den VSMC aus KO Tieren nicht gegeben. Eine

Hemmung des SOCE durch die NO/cGMP/cGK-Signalkaskade wurde bereits von mehreren Gruppen bestätigt. So konnten (Chen et al. 2011) bei einer Inhibierung der cGK1 eine deutliche Steigerung des SOCE beobachten. (Wang et al. 2009) wiesen einen verminderten SOCE in Lungenarterien in Gegenwart von Sildenafil nach, zudem war die SOCE abhängige Proliferation durch 8 Br-cGMP gehemmt. (Moneer et al. 2003) konnten den SOCE mit NO Analoga in VSMC der Ratte inhibieren und diesen Effekt auf die Notwendigkeit der Bildung von cGMP zurückführen. (Ay et al. 2006) wiesen eine Hemmung des SOCE mittels DETA-NO und 8 Br-cGMP in Lungenarterien von Schweinen nach. Wie sich diese Effekte der cGK abhängigen SOCE Hemmung erklären, bleibt allerdings schwierig, da, wie eingangs unter 1.2.1.2 erwähnt, der mechanistische Zusammenhang zwischen SR Entleerung und SOCE Aktivierung noch weiterer Klärung bedarf. Zudem ist bislang nicht abschließend geklärt, welche Proteine als SOCE Kanäle fungieren. Ein Mechanismus zur cGMP abhängigen Inhibierung des SOCE wurde von (Cohen et al. 1999) beschrieben. Diese Gruppe beobachtete eine schnellere Befüllung des SR durch gesteigerte Aktivität der SERCA in Gegenwart von NO. Dadurch bedingt war der Stimulus für den SOCE abgeschaltet. Dieser Mechanismus der Hemmung kommt für unsere VSMC allerdings nicht in Frage, da SERCA durch Thapsigargin blockiert wurde. Eine Rolle von STIM und Orai scheint primär nicht gegeben, da weder die drei Orai Isoformen noch STIM1 potentielle Phosphorylierungsstellen für cGK1 aufweisen (Blackmore 2010). Lediglich STIM2 weist potentielle Phosphorylierungsstellen auf. Da es zudem als Inhibitor von STIM1 etabliert wurde (Soboloff et al. 2006), kommt dieser Möglichkeit zumindest eine theoretische Bedeutung zu. (Wang et al. 2007) konnten eine cGK1 α abhängige Hemmung der SOCE in Mesangialzellen durch SNP und 8 Br-cGMP zeigen. Eine Phosphorylierung von VASP führte dabei zur Hemmung des von TRPC4 vermittelten SOCE. Die Tatsache, dass die Inhibierbarkeit von der Anwesenheit extrazellulären Natriums abhängt und der Unterschied der Inhibierbarkeit vom spannungsabhängigen Calciumeinstrom, lässt eine Beteiligung der TRPC Kanäle als unspezifische Kationenkanäle als sehr wahrscheinlich erscheinen. So konnten zudem (Rosker et al. 2004) in HEK Zellen nachweisen, dass der durch Carbachol vermittelte Anstieg intrazellulären Calciums nur zu einem geringen Teil durch TRPC3 vermittelt wurde. Ein viel größerer Teil wurde durch den Natrium Calcium Antiporter (NCX) im reverse mode in die Zellen transportiert. Als ursächlich hierfür wurde eine Assoziation des TRPC3 mit NCX gezeigt, bei der die hohe Natriumleitfähigkeit des TRPC Kanals als aktivierendes Element für den NCX vermittelten Calciumeinstrom diene. Von (Eder et al. 2007) wurde dieser funktionale Kopplung aus TRPC3 und NCX ebenso in kardialen Myozyten beschrieben. Für die Beteiligung dieses Mechanismus sprechen mehrere Gründe. So wurde TRPC3 als cGK1 Substrat etabliert. Eine Phosphorylierung durch

cGK1 an Threonin11 und Serin263 führte in HEK Zellen zu einer Inhibierung des TRPC3 vermittelten SOCE (Kwan et al. 2004). In vivo wurde zudem eine gesteigerte Glattmuskelrelaxierung durch eine cGK abhängige Hemmung von TRPC1 und TRPC3 gezeigt (Chen et al. 2009). TRPC3 wurde zudem nach widersprüchlichen Berichten über seine Aktivierbarkeit durch die Generierung der TRPC3 KO Maus als SOCE Kanal bestätigt. TRPC3 defiziente Mäuse zeigten eine 50% geringere SOCE auf als die WT Kontrollen (Kim, Hong et al. 2009). (Zhang et al. 2005) konnten zudem eine Hochregulation von NCX in proliferativen VSMC nachweisen. Überdies festigt sich immer mehr die Bedeutung des NCX für den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Liu et al. 2010). Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des TRPC3 an der unterschiedlichen Hemmbarkeit von WT und KO VSMC ist seine Fähigkeit zur Interaktion mit IP₃-Rezeptoren. (Tang et al. 2001) zeigten in vitro, dass alle TRPC Isoformen mit ihrem C-Terminus IP₃-R binden können. Durch diese Bindung wird inhibierendes Calmodulin vom TRPC verdrängt und es kommt zur Aktivierung. Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass diese Kopplung auch in vivo auftritt (Xi et al. 2008; Adebiyi et al. 2010) In zerebralen Arterien und VSMC führte hierbei eine Kopplung von IP₃-R mit TRPC3, nicht aber TRPC6, bei Gabe von IP₃ zu einem Anstieg der TRPC3 vermittelten Calciumkonzentration. Zudem zeigten (Birnbauer et al. 2000) eine Kopplung von TRPC Kanälen und IP₃R beim Auftreten der SOCE.

Übertragen auf unsere Experimente führt die Entspeicherung des SR zu einem, wie unter 1.2.1.2 erörtert, zur Aktivierung von STIM1 und eventuell zur Freisetzung von 'Calcium induced factor' (CIF) und konsekutiver Öffnung von SOCE Kanälen (siehe hierzu auch Abbildung 37), zum anderen auch zur Kopplung von IP₃R1 an TRPC3 und dessen Aktivierung. Durch diese Kopplung gelangt in den WT VSMC auch cGK1 β , über den trimeren Komplex aus IP₃R1, IRAG und cGK1 β , in unmittelbare räumliche Nähe des TRPC3. Dieser könnte somit cGMP abhängig phosphoryliert und gehemmt werden. Damit ließe sich bei Gabe von 8 Br-cGMP ein unterschiedlich starker Einstrom von Natrium in die WT und KO VSMC erklären. Der Unterschied in der Inhibierbarkeit des SOCE ließe sich dann wiederum auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückführen. Durch die unterschiedlichen intrazellulären Natriumkonzentrationen wäre sowohl die Triebkraft für den NCX abhängigen Calciumeinstrom in WT VSMC geringer, ebenso wie die Membrandepolarisation und nachfolgend die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Dies würde auch die verminderte Hemmbarkeit des SOCE bei Abwesenheit extrazellulären Natriums erklären, da durch den nicht vorhandenen Natriumeinstrom keiner der beiden Calcium erhöhenden Mechanismen wirksam wird.

Zudem konnte bei den Versuchen mit 2 APB kein Unterschied zwischen WT und KO VSMC festgestellt werden. 2 APB gilt als Blocker des SOCE und hemmt unter anderem die TRPC Kanäle (Trebak et al. 2002; Lievreumont et al. 2005). Dies impliziert, dass in beiden Zelllinien die SOCE vermittelnden Kanäle in gleichem Ausmaß gehemmt werden. Da der SOCE in WT und KO zudem gleich groß ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese Kanäle auch gleichermaßen exprimiert sind, so dass eine unterschiedliche Regulation noch wahrscheinlicher erscheint.

Für die unterschiedliche Natriumleitfähigkeit sprächen auch die Versuche mit Charybdotoxin (CHX) und Flufenaminsäure. Der verminderte SOCE von WT VSMC in Gegenwart von CHX erklärte sich durch die Blockade der Calciumabhängigen Kaliumkanäle. Dadurch kommt es zur Depolarisation, die aber aufgrund der Anwesenheit von Nifedipin keinen zusätzlichen Einstrom von Calcium durch CaV1.2 verursacht. Durch das erhöhte Membranpotential bedingt ist aber der Einstrom von Calcium über andere Kanäle aufgrund der verminderten elektrischen Triebkraft für Calcium vermindert. Umgekehrt konnte bei den Experimenten mit Flufenaminsäure und Nifedipin eine tendenzielle Erhöhung des SOCE im WT detektiert werden, was sich über einem Verbleib negativer Ladung im Zytosol und folglich einer erhöhten elektrischen Triebkraft für Calcium erklärt. Die Tatsache, dass eine Hemmung des SOCE in KO VSMC in Gegenwart von Nifedipin und CHX nicht beobachtet werden kann, könnte dann mit einem bereits in den Kontrollen leicht erhöhten Membranpotential, aufgrund einer erhöhten Natriumleitfähigkeit durch TRPC3 erklärt werden. So ergaben sich zwar bei den Membranpotentialmessungen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO VSMC, dennoch war das Membranpotential der KO VSMC höher als das der WT VSMC. Umgekehrt bedeutete aber die veränderte Natriumleitfähigkeit der KO VSMC für die Experimente mit Flufenaminsäure eine weniger starke Hyperpolarisation und einem im Vergleich zu den WT VSMC verminderten elektrischen Antrieb für den Calciumeinstrom. Da der Unterschied zwischen den WT und KO VSMC in Gegenwart von Flufenaminsäure und Nifedipin allerdings sehr groß ist und zudem mit Nifluminsäure bestätigt werden konnte, verbirgt sich hinter diesem Effekt möglicherweise noch ein weiterer Unterschied zwischen KO und WT Tieren, der alleine mit einer unterschiedlichen Natriumleitfähigkeit nicht erklärt werden kann. Da die Fenamate allerdings sehr unselektive Chloridkanalblocker sind, fällt eine genaue Beurteilung des Unterschieds schwer. So wurde eine Blockade unselektiver Kationenkanäle beschrieben, bei denen es sich eventuell um TRPC Kanäle handelt (Gogelein et al. 1990). Dies würde auch die starke Hemmung des SOCE ohne Nifedipin erklären. Überdies wurden auch von einer Blockade spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanälen berichtet (Doughty et al. 1998) und eine Aktivierung des BK-Kanal durch Fenamate gezeigt (Greenwood and Large 1995; Toma et

al. 1996). Da die Fenamate zudem als nichtsteroidale Schmerzmittel die Cyclooxygenase inhibieren, tragen sie möglicherweise auf diesem Wege zu einer Erhöhung der Arachidonsäurekonzentration bei und führen somit zu einer Aktivierung Arachidonsäure sensibler Calciumkanäle (Shuttleworth and Thompson 1999), so dass es sich bei den beobachteten Unterschieden möglicherweise um die Interaktion mit einem weiteren Calciumsignalweg handelt. Dies wäre durch weitere Untersuchungen zu klären.

Bemerkenswerterweise konnte bei den Membranpotentialmessungen keine Membrandepolarisation während dem SOCE detektiert werden. Dies könnte im Falle der Kontrollen noch über das Ruhemembranpotential erklärt werden. In der Literatur finden sich Werte von -70 bis -40 mV für VSMC. Die Aktivierungsschwelle für CaV1.2 liegt bei circa -40 mV, das Aktivitätsmaximum bei 0 mV (House, Potier et al. 2008). Durch verändertes Splicing des CaV1.2, wie von Tiwari und Kollegen beschrieben könnte die Aktivierungsschwelle sogar noch auf circa -55 mV sinken. Liegt das Ruhemembranpotential knapp unterhalb der Aktivierungsschwelle von CaV1.2, so könnte bereits eine geringe Membranpotentialerhöhung ausreichen um den spannungsabhängigen Calciumeinstrom zu aktivieren. Dieser Effekt wurde bereits von (Salomonsson et al. 2010) beschrieben. Eine geringe Potentialerhöhung könnte durchaus unerkannt bleiben, da Potentialfarbstoffe als nicht sehr sensitiv gelten. Calcium könnte somit über beide Wege erhöht werden, dadurch zur Aktivierung der calciumabhängigen Kaliumkanäle und der beobachteten Depolarisation führen. Bei Inkubation mit 8 Br-cGMP allerdings konnte ein stark erniedrigtes Membranpotential nachgewiesen werden. Dies beruht vermutlich auf einer Interaktion der Kinase mit dem BK-Kanal. (Sausbier, Schubert et al. 2000) zeigten die Phosphorylierung und Aktivierung des BK-Kanals durch cGK1 an murinen VSMC. Dass unter diesen Bedingungen eine globale Depolarisation, die zur Aktivierung des Cav1.2 führt, unerkannt bleibt, ist eher unwahrscheinlich. Die Kaskade von TRPC3 und NCX dürfte hiervon unbeeinflusst bleiben, da beide Proteine im Komplex vorliegen. Signale kommen somit nur in lokalen Mikrodomänen zustande und Natrium, welches durch TRPC3 ins Zellinnere gelangt, kann sofort vom NCX im Austausch gegen Calcium aus der Zelle transportiert werden. Durch den Austausch von drei Natriumionen gegen ein Calciumion trägt dieser Prozess zudem zur Hyperpolarisation der Membran bei. Es stellt sich somit die Frage, wieso sich Unterschiede in der Hemmbarkeit der SOCE mit 8 Br-cGMP in Gegenwart von Nifedipin ergeben, obwohl diese Bedingungen eine Beteiligung des Cav1.2 am Calciumeinstrom eigentlich nicht zulassen. Dies ist aber sowohl im Falle der KO VSMC zu beobachten, als auch für den SOCE in KO und WT VSMC bei Abwesenheit extrazellulären Natriums. Eine mögliche Ursache könnte die Organisation der Calciumkanäle in den bereits erwähnten lipid rafts darstellen. Ein an der Organisation dieser Mikrodomänen beteiligtes Regulatorprotein ist Homer1 (Worley et al.

2007). Dieses ist sowohl an der Bildung der Mikrodomänen beteiligt wie auch an der Aktivierung der TRPC Kanäle (Yuan et al. 2003; Kim et al. 2006). Zum anderen wurde auch wiederholt eine Interaktion von Cav1.2 mit Homer1 beschrieben (Yamamoto et al. 2005; Huang et al. 2007). Somit wäre ein Mechanismus gegeben, der sowohl die TRPC Kanäle als auch Cav1.2 innerhalb einer Mikrodomäne in unmittelbare räumliche Nähe brächte. Auf diesem Wege könnten lokal ausreichend hohe Natriumspiegel erreicht werden, um eine Aktivierung des Cav1.2 zu erreichen. Umgekehrt würde in jenen Mikrodomänen aus TRPC3 und NCX eine lokale Hyperpolarisation erreicht, der Nettofluss positiver Ladungsträger über die Membran wäre somit ausgeglichen und durch den FLIPR kit nicht mehr zu detektieren. Allerdings werden von einigen Autoren auch Wirkungen von Nifedipin berichtet, die nicht durch eine Hemmung des Cav1.2 erklärt werden können. So stellten (Colucci et al. 2009) eine Hemmung des SOCE durch Nifedipin unabhängig vom Membranpotential fest. Diese Hemmung trat bereits bei der von uns verwendeten Konzentration von 10 μM auf. (Curtis and Scholfield 2001) beobachteten sogar eine Inhibierung des SOCE mit Nifedipin in einer Konzentration von 1 μM , bei einem Membranpotential von -80 mV . In diesem Bereich zeigt Cav1.2 sicherlich keine Aktivität mehr. Ob nun die Effekte bei der Kombination aus Nifedipin und 8 Br-cGMP spezifisch sind, bleibt zu klären.

Interessanterweise konnte die Bedeutung von IRAG für die cGMP abhängige Inhibierung des SOCE von Dr. Matthias Desch und Frau Petra Rothhammer durch Kraftmessungen an Aortenstücken bestätigt werden (Posterbeitrag Hieke et al. Jahrestagung DGPT 2011). WT Aorten reagierten beim SOCE mit einem signifikant verminderten Tonus bei Anwesenheit von 8 Br-cGMP. Bei Aorten aus KO Tieren war dies nicht zu beobachten. Zusammenfassend ist IRAG somit an einem weiteren Mechanismus zur Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt. Nach unseren Untersuchungen wird der SOCE in WT VSMC durch cGMP Stimulation IRAG abhängig gehemmt. An diesem Mechanismus ist extrazelluläres Natrium beteiligt.

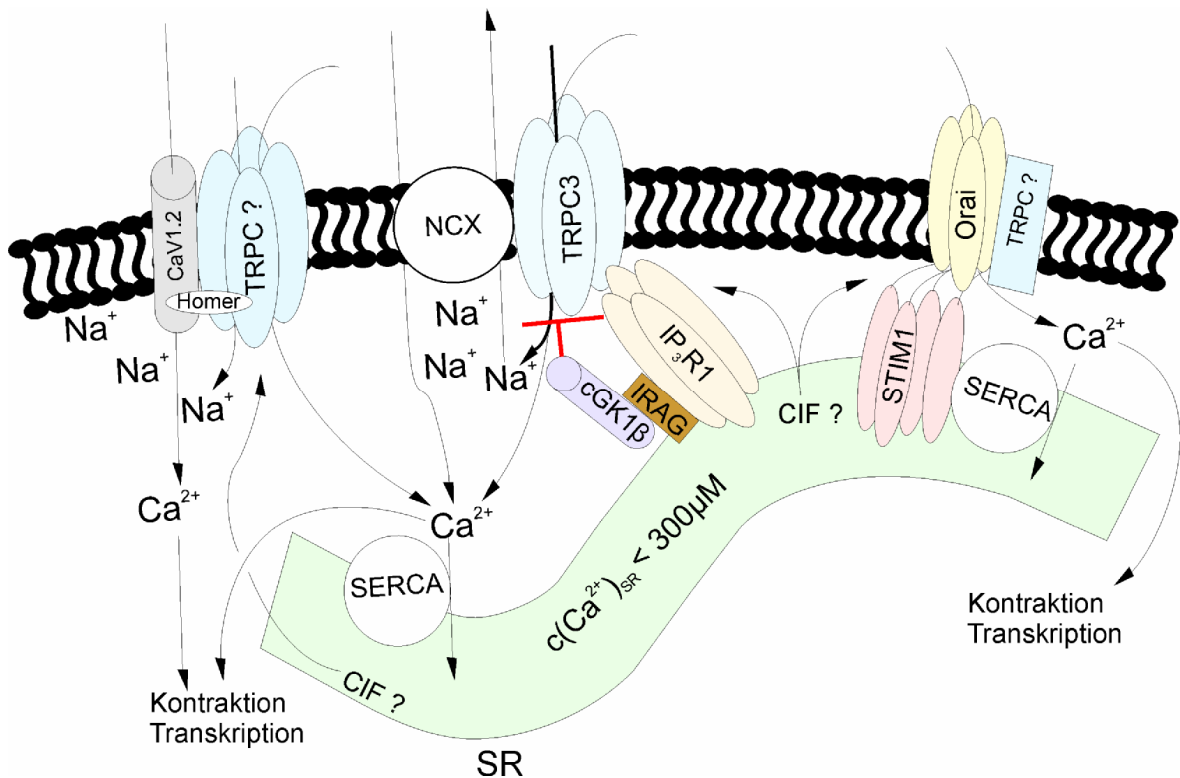


Abbildung 37: Potentieller Mechanismus der SOCE und SOCE Hemmung durch cGK1β/IRAG

Durch Absinken der Calciumkonzentration im SR kommt es zur Freisetzung beziehungsweise Freisetzung von CIF und zur Organisation von STIM1 in Plasmamembran nahen Domänen. Dies führt zu Aktivierung des SOCE. So rekrutiert STIM1 die Orai Calciumkanäle. An diesem Komplex sind möglicherweise TRPC Kanäle und SERCA beteiligt. Eine weitere Calciumquelle könnte ein Homer1 vermittelter Komplex aus TRPC Kanälen und spannungsabhängigem CaV1.2 darstellen. Durch die lokal erhöhte Natriumkonzentration käme es zur Membrandepolarisation und folglich zum zusätzlichen Einstrom von Calcium durch CaV1.2. Ebenso kommt es zur Bindung von IP₃R1 mit TRPC3, wodurch TRPC3 aktiviert wird. Durch diese Aktivierung resultiert ein unselektiver Einstrom von Natrium und Calcium. An diesem makromolekularen Komplex könnten zudem NCX, ebenso wie IRAG und cGK1β beteiligt sein. Durch die hohe intrazelluläre Natriumkonzentration bedingt arbeitet NCX im 'reverse mode', es kommt zum zusätzlichen Einstrom von Calcium. Durch die räumliche Nähe von cGK1β und TRPC3, wäre eine inhibierende Phosphorylierung des TRPC3 möglich, wodurch dieser Mechanismus blockiert wäre. Abkürzungen: CIF ('calcium induced factor'); STIM1 ('stromal interacting molecule 1'); SOCE ('store operated Calcium entry'); TRPC ('transient receptor potential'); SR (Sarkoplasmatisches Retikulum); SERCA (SR-Calcium ATPase); NCX (Natrium/Calcium-Austauscher); IP₃R1 (Inositoltriphosphat Rezeptor1); cGK1β (cGMP abhängige Kinase1β); IRAG (IP₃R assoziiertes cGK Substrat); CaV (spannungsabhängiger Calciumkanal)

5. Zusammenfassung

Die NO/cGMP/cGK Signalkaskade ist von zentraler Bedeutung für den myogenen Tonus glattmuskulärer Organe. Ihre gefäßrelaxierende Wirkung beruht hierbei zu großen Teilen auf der Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Diese wird vor allem durch die Modulation und Interaktionen der Substrate der cGKinase vermittelt.

Das IP₃R1 assoziierte cGKinase Substrat (IRAG) ist hierbei ein stabil in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums verankertes Protein. Es bildet einen trimeren Komplex mit cGK1 β und IP₃R1. Durch die Deletion von Exon 12 im IRAG codierenden Gen wurde in früheren Arbeiten eine Mauslinie generiert, deren verkürztes IRAG IP₃R1 nicht mehr bindet. Anhand dieser Tiere konnte bereits ein Defekt in der Calciumregulation glattmuskulärer Organe gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion von IRAG vor allem im Hinblick auf die Regulation der Calciumhomöostase im glatten Muskel untersucht. Diese Untersuchungen wurden an der kürzlich generierten IRAG Knockout Maus durchgeführt.

Bei der Analyse der Proteine des trimeren Komplexes in glattmuskulären Organen der IRAG KO Tiere war die Expression der cG-Kinasen deutlich verändert im Vergleich zu den Organen aus WT Tieren. In allen untersuchten Organen war eine verminderte cGK1 β Expression zu detektieren. Eine Hochregulation von cGK1 α , wie bei den IRAG Δ 12 Tieren beobachtet werden konnte, war mit Ausnahme des Magens nicht gegeben.

Die Expression der IP₃Rezeptoren war wenig verändert. Lediglich im Magen war IP₃R2 hochreguliert, im Jejunum war kein IP₃R3 mehr zu detektieren. Hierdurch wäre eine Funktion von IRAG auch bei der Exkretion von Verdauungssekreten denkbar.

Bei Immunfärbungen wurde der trimere Komplex in VSMC nachgewiesen. IRAG zeigte starke Kolo-kalisation mit cGK1 β und IP₃R1, nicht aber mit cGK1 α . In VSMC aus KO Tieren war keine unterschiedliche Verteilung der Proteine zu erkennen. Auch bei Stimulation mit cGMP waren keine Unterschiede in der Lokalisation der Proteine in den KO oder WT VSMC zu erkennen. Dies betraf sowohl ihre absolute Lage innerhalb der Zelle, als auch ihre relative Lage zu anderen Zellorganellen. Eine Kerntranslokation der cG-Kinasen fand nicht statt.

Durch Experimente an VSMC von WT Mäusen wurde in dieser Arbeit die 8 Br-cGMP abhängige Inhibierung der Calciumfreisetzung gezeigt. Dieser Effekt war an die Anwesenheit von IRAG gebunden und war in VSMC aus IRAG KO Tieren nicht zu beobachten. Dies bestätigt die Ergebnisse aus früheren Versuchen mit IRAG Δ 12 Tieren. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von IRAG auch für die verminderte Calciumfreisetzung durch die Generierung endogenen cGMPs gezeigt.

Hiervon waren sowohl der Signalweg der löslichen Guanylatzyklase mit DEA NO als auch der partikulären Guanylatzyklase mit ANP betroffen.

Wie bei den VSMC aus $\Delta 12$ Tieren bereits beschrieben, war kein Effekt von IRAG auf den spannungsabhängigen Calciumeinstrom zu detektieren.

Weiterhin wurde eine Beteiligung von IRAG am SOCE gezeigt. Dieser war in VSMC von WT Tieren in Gegenwart von 8 Br-cGMP stark vermindert. Diese Inhibition war von der Anwesenheit extrazellulären Natriums abhängig. In VSMC aus KO Tieren war diese Inhibition nicht zu beobachten. Zudem zeigten die VSMC beim SOCE unterschiedliche Triebkraft für Kalium und Chloridionen. Unterschiede im Membranpotential waren hierbei nicht zu detektieren.

Innerhalb der verschiedenen Calciumsignalwege zeigen diese Befunde die Funktion von IRAG zur cGMP abhängigen Senkung des Hormon vermittelten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration. Calciumfreisetzung und SOCE hängen mechanistisch eng zusammen. Bei einer Entspeicherung des SR kommt es folglich immer zum SOCE. Die Wirkung von IRAG wäre hierbei synergistisch, sowohl zur Hemmung der Entspeicherung, wie auch zur Hemmung des Einstroms.

7. Literaturverzeichnis

7.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Adebiyi, A., et al. (2010). "Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility." Circ Res **106**(10): 1603-12.
- Akata, T. (2007a). "Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone." J Anesth **21**(2): 220-31.
- Akata, T. (2007b). "Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells." J Anesth **21**(2): 232-42.
- Alp, N. J. and K. M. Channon (2004). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(3): 413-20.
- Ammendola, A., et al. (2001). "Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β ." J Biol Chem **276**(26): 24153-9.
- Antl, M., et al. (2007). "IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation." Blood **109**(2): 552-9.
- Ay, B., et al. (2006). "Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca²⁺ influx in airway smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(2): L278-83.
- Baryshnikov, S. G., et al. (2009). "Orai1, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry, is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes." Am J Physiol Cell Physiol **297**(5): C1103-12.
- Berra-Romani, R., et al. (2008). "Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture." Am J Physiol Cell Physiol **295**(3): C779-90.
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature **361**(6410): 315-25.
- Berridge, M. J. (2008). "Smooth muscle cell calcium activation mechanisms." J Physiol **586**(Pt 21): 5047-61.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1984). "Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction." Nature **312**(5992): 315-21.
- Bezprozvanny, I. (2005). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Cell Calcium **38**(3-4): 261-72.
- Biel, M. (2009). "Cyclic nucleotide-regulated cation channels." J Biol Chem **284**(14): 9017-21.
- Birnbaumer, L. (2009). "The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 395-426.
- Birnbaumer, L., et al. (2000). "Mechanism of capacitative Ca²⁺ entry (CCE): interaction between IP3 receptor and TRP links the internal calcium storage compartment to plasma membrane CCE channels." Recent Prog Horm Res **55**: 127-61; discussion 161-2.
- Blackmore, P. F. (2010). "Biphasic effects of nitric oxide on calcium influx in human platelets." Thromb Res **127**(1): e8-14.
- Blaustein, M. P. and W. J. Lederer (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." Physiol Rev **79**(3): 763-854.
- Bolotina, V. M. (2008). "Orai, STIM1 and iPLA2 β : a view from a different perspective." J Physiol **586**(13): 3035-42.

- Bootman, M. D., et al. (2001). "The organisation and functions of local Ca^{2+} signals." J Cell Sci **114**(Pt 12): 2213-22.
- Brini, M. and E. Carafoli (2009). "Calcium pumps in health and disease." Physiol Rev **89**(4): 1341-78.
- Broderick, K. E., et al. (2007). "Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase induce interleukin-6 transcription in osteoblasts." Mol Endocrinol **21**(5): 1148-62.
- Browning, D. D., et al. (2001). "Functional analysis of type 1 α cGMP-dependent protein kinase using green fluorescent fusion proteins." J Biol Chem **276**(16): 13039-48.
- Butt, E., et al. (1994). "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets." J Biol Chem **269**(20): 14509-17.
- Cahalan, M. D. (2009). "STIMulating store-operated Ca^{2+} entry." Nat Cell Biol **11**(6): 669-77.
- Camacho, P. and J. D. Lechleiter (1993). "Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase." Science **260**(5105): 226-9.
- Casteel, D. E., et al. (2008). "cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity." Cell Signal **20**(7): 1392-9.
- Castro, L. R., et al. (2010). "Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes." Circ Res **107**(10): 1232-40.
- Chamley-Campbell, J. H., et al. (1981). "Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens." J Cell Biol **89**(2): 379-83.
- Chen, I. S., et al. (2011). "Protein kinases modulate store-operated channels in pulmonary artery smooth muscle cells." J Biomed Sci **18**: 2.
- Chen, J., et al. (2009). "Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(1): H417-24.
- Chen, L., et al. (2004). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1403-8.
- Chen, Z., et al. (2009). "Extracellular ATP-induced nuclear Ca^{2+} transient is mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse pancreatic beta-cells." Biochem Biophys Res Commun **382**(2): 381-4.
- Cheng, K. T., et al. (2011). "Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions." PLoS Biol **9**(3): e1001025.
- Cohen, R. A., et al. (1999). "Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx." Circ Res **84**(2): 210-9.
- Collins, S. P. and M. D. Uhler (1999). "Cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases differ in their regulation of cyclic AMP response element-dependent gene transcription." J Biol Chem **274**(13): 8391-404.
- Colucci, A., et al. (2009). "Effect of nifedipine on capacitive calcium entry in Jurkat T lymphocytes." Arch Biochem Biophys **481**(1): 80-5.
- Curtis, T. M. and C. N. Scholfield (2001). "Nifedipine blocks Ca^{2+} store refilling through a pathway not involving L-type Ca^{2+} channels in rabbit arteriolar smooth muscle." J Physiol **532**(Pt 3): 609-23.
- De Smedt, H., et al. (1994). "Determination of relative amounts of inositol trisphosphate receptor mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction." J Biol Chem **269**(34): 21691-8.
- Desch, M., et al. (2010). "IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation." Cardiovasc Res **86**(3): 496-505.

- Dey, N. B., et al. (2009). "Cyclic GMP specifically suppresses Type-I α cGMP-dependent protein kinase expression by ubiquitination." Cell Signal **21**(6): 859-66.
- Diaz-Munoz, M., et al. (2008). "Granulosa cells express three inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms: cytoplasmic and nuclear Ca²⁺ mobilization." Reprod Biol Endocrinol **6**: 60.
- Dietrich, A., et al. (2007). "Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1." Pflugers Arch **455**(3): 465-77.
- Doughty, J. M., et al. (1998). "Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel." J Physiol **507** (Pt 2): 433-9.
- Earley, S. and J. E. Brayden (2010). "Transient receptor potential channels and vascular function." Clin Sci (Lond) **119**(1): 19-36.
- Eder, P., et al. (2007). "Phospholipase C-dependent control of cardiac calcium homeostasis involves a TRPC3-NCX1 signaling complex." Cardiovasc Res **73**(1): 111-9.
- Ellerbroek, S. M., et al. (2003). "Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo." J Biol Chem **278**(21): 19023-31.
- Eto, M., et al. (1995). "A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization." J Biochem **118**(6): 1104-7.
- Feil, R., et al. (2002). "Functional reconstitution of vascular smooth muscle cells with cGMP-dependent protein kinase I isoforms." Circ Res **90**(10): 1080-6.
- Fellner, S. K. and W. J. Arendshorst (2009). "Complex interactions of NO/cGMP/PKG systems on Ca²⁺ signaling in afferent arteriolar vascular smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **298**(1): H144-51.
- Forrest, A. S., et al. (2010). "Intricate interaction between store-operated calcium entry and calcium-activated chloride channels in pulmonary artery smooth muscle cells." Adv Exp Med Biol **661**: 31-55.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-14.
- Forstermann, U., et al. (1991). "Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types." Biochem Pharmacol **42**(10): 1849-57.
- Francis, S. H., et al. (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." Pharmacol Rev **62**(3): 525-63.
- Frei, E., et al. (2009). "Calcium-dependent and calcium-independent inhibition of contraction by cGMP/cGKI in intestinal smooth muscle." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **297**(4): G834-9.
- Freichel, M., et al. (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice." Nat Cell Biol **3**(2): 121-7.
- Furuichi, T. and K. Mikoshiba (1995). "Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-mediated Ca²⁺ signaling in the brain." J Neurochem **64**(3): 953-60.
- Futatsugi, A., et al. (2005). "IP₃ receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism." Science **309**(5744): 2232-4.
- Gambaryan, S., et al. (1996). "Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression." J Clin Invest **98**(3): 662-70.
- Garthwaite, J. (2010). "New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications." Mol Cell Biochem **334**(1-2): 221-32.
- Geiselhoring, A., et al. (2004a). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." FEBS Lett **575**(1-3): 19-22.
- Geiselhoring, A., et al. (2004b). "IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase." Embo J **23**(21): 4222-31.
- Gogelein, H., et al. (1990). "Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas." FEBS Lett **268**(1): 79-82.

- Gohla, A., et al. (2000). "Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction." Circ Res **87**(3): 221-7.
- Gong, M. C., et al. (1997). "Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle." J Biol Chem **272**(16): 10704-9.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.
- Greenwood, I. A. and W. A. Large (1995). "Comparison of the effects of fenamates on Ca-activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells." Br J Pharmacol **116**(7): 2939-48.
- Griffith, K. J., et al. (1997). "Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum **40**(9): 1693-702.
- Grynkiewicz, G., et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-50.
- Gudi, T., et al. (2000). "NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation." Oncogene **19**(54): 6324-33.
- Hagiwara, M., et al. (1993). "Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A." Mol Cell Biol **13**(8): 4852-9.
- Hartshorne, D. J. (1998). "Myosin phosphatase: subunits and interactions." Acta Physiol Scand **164**(4): 483-93.
- Hirata, K., et al. (2002). "The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca²⁺ waves in rat hepatocytes." Gastroenterology **122**(4): 1088-100.
- Hofmann, F., et al. (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." J Cell Sci **113** (Pt 10): 1671-6.
- Hofmann, F., et al. (2009). "cGMP regulated protein kinases (cGK)." Handb Exp Pharmacol(191): 137-62.
- Hofmann, F., et al. (2006). "Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion." Physiol Rev **86**(1): 1-23.
- Hoofnagle, M. H., et al. (2006). "Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2579-81.
- House, S. J., et al. (2008). "The non-excitable smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease." Pflugers Arch **456**(5): 769-85.
- Huang, G., et al. (2007). "Ca²⁺ signaling in microdomains: Homer1 mediates the interaction between RyR2 and Cav1.2 to regulate excitation-contraction coupling." J Biol Chem **282**(19): 14283-90.
- Huang, J., et al. (2007). "Inhibition of Gq-dependent PLC-beta1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C200-8.
- Huh, Y. H., et al. (2007). "Comparison of and chromogranin effect on inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity of cytoplasmic and nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channels." Biochemistry **46**(49): 14032-43.
- Jardin, I., et al. (2008). "Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1." Channels (Austin) **2**(6): 401-3.
- Jorgensen, A. O., et al. (1988). "A monoclonal antibody to the Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum cross-reacts with slow type I but not with fast type II canine skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and immunochemical study." Cell Motil Cytoskeleton **9**(2): 164-74.
- Kamishima, T. and J. M. Quayle (2003). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac and smooth muscle cells." Biochem Soc Trans **31**(Pt 5): 943-6.
- Kanashiro, C. A. and R. A. Khalil (1998). "Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells." Clin Exp Pharmacol Physiol **25**(12): 974-85.
- Kaneko, T., et al. (2000). "Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 110-6.
- Khalil, R. A. (2010). "Regulation of Vascular Smooth Muscle Function." PMID: 21634065 **Morgan & Claypool Life Sciences**(Bookshelf ID: NBK54584).

- Khalil, R. A., et al. (1995). "Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells." Circ Res **76**(6): 1101-8.
- Kim, H. R., et al. (2008). "Smooth muscle signalling pathways in health and disease." J Cell Mol Med **12**(6A): 2165-80.
- Kim, J. Y., et al. (2006). "Homer 1 mediates store- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent translocation and retrieval of TRPC3 to the plasma membrane." J Biol Chem **281**(43): 32540-9.
- Kim, M. S., et al. (2009). "Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca^{2+} influx and the severity of acute pancreatitis." Gastroenterology **137**(4): 1509-17.
- Kitazawa, T., et al. (2003). "Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca^{2+} sensitization in rabbit smooth muscle." J Physiol **546**(Pt 3): 879-89.
- Kjer-Nielsen, L., et al. (1999). "A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins." Curr Biol **9**(7): 385-8.
- Koitabashi, N., et al. (2010). "Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition." J Mol Cell Cardiol **48**(4): 713-24.
- Koller, A., et al. (2003). "Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 155-60.
- Komalavilas, P. and T. M. Lincoln (1996). "Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta." J Biol Chem **271**(36): 21933-8.
- Kusnier, C., et al. (2006). "Single-channel recording of inositol trisphosphate receptor in the isolated nucleus of a muscle cell line." Biol Res **39**(3): 541-53.
- Kwan, H. Y., et al. (2004). "Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2625-30.
- Lalli, M. J., et al. (1999). "[Ca^{2+}]i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): H963-70.
- Lee, C. H., et al. (2002). "Sequential opening of IP(3)-sensitive Ca^{2+} channels and SOC during alpha-adrenergic activation of rabbit vena cava." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(5): H1768-77.
- Lee, M. R., et al. (1997). "Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase." J Biol Chem **272**(8): 5063-8.
- Leung, F. P., et al. (2008). "Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle." Br J Pharmacol **153**(5): 846-57.
- Liao, Y., et al. (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2895-900.
- Liao, Y., et al. (2009). "A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3202-6.
- Lievremont, J. P., et al. (2005). "Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane." Mol Pharmacol **68**(3): 758-62.
- Lincoln, T. M., et al. (2001). "Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression." J Appl Physiol **91**(3): 1421-30.
- Lincoln, T. M., et al. (2006). "Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase." Front Biosci **11**: 356-67.
- Liou, J., et al. (2005). "STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx." Curr Biol **15**(13): 1235-41.
- Liu, B., et al. (2010). "Reverse mode $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange mediated by STIM1 contributes to Ca^{2+} influx in airway smooth muscle following agonist stimulation." Respir Res **11**: 168.

- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Lytton, J., et al. (1991). "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." J Biol Chem **266**(26): 17067-71.
- Marchant, J. S. and C. W. Taylor (1997). "Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca²⁺ safeguards against spontaneous activity." Curr Biol **7**(7): 510-8.
- Masuda, W., et al. (2010). "InsP3R-associated cGMP kinase substrate determines inositol 1,4,5-trisphosphate receptor susceptibility to phosphoregulation by cyclic nucleotide-dependent kinases." J Biol Chem **285**(48): 37927-38.
- McDaniel, S. S., et al. (2001). "Capacitative Ca²⁺ entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(5): L870-80.
- McDonald, T. F., et al. (1994). "Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells." Physiol Rev **74**(2): 365-507.
- Mercer, J. C., et al. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-90.
- Mignen, O., et al. (2008). "Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore." J Physiol **586**(2): 419-25.
- Misquitta, C. M., et al. (1999). "Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves." Cell Calcium **25**(4): 277-90.
- Missiaen, L., et al. (1992). "Calcium ion homeostasis in smooth muscle." Pharmacol Ther **56**(2): 191-231.
- Moneer, Z., et al. (2003). "Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca²⁺-entry pathways regulated by vasopressin." Biochem J **370**(Pt 2): 439-48.
- Morel, J. L., et al. (2003). "Crucial role of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for acetylcholine-induced Ca²⁺ oscillations in vascular myocytes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1567-75.
- Munoz, E., et al. (2011). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by enabling the Ca²⁺-dependent inactivation of calcium release-activated calcium/orai channels normally prevented by mitochondria." J Biol Chem **286**(18): 16186-96.
- Murthy, K. S. and H. Zhou (2003). "Selective phosphorylation of the IP3R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(2): G221-30.
- Osei-Owusu, P., et al. (2007). "Regulation of RGS2 and second messenger signaling in vascular smooth muscle cells by cGMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **282**(43): 31656-65.
- Ozawa, T. (2010). "Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review)." Mol Med Report **3**(2): 199-204.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
- Patel, S., et al. (1999). "Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Cell Calcium **25**(3): 247-64.
- Peel, S. E., et al. (2008). "ORAI and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(6): 744-9.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem **83**(2): 346-56.
- Pfeifer, A., et al. (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082-6.
- Pilz, R. B. and K. E. Broderick (2005). "Role of cyclic GMP in gene regulation." Front Biosci **10**: 1239-68.
- Poburko, D., et al. (2007). "Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na⁺] transients drive Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells." Circ Res **101**(10): 1030-8.

- Potier, M. and M. Trebak (2008). "New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway." *Pflugers Arch* **457**(2): 405-15.
- Potter, L. R. (2011). "Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases." *Pharmacol Ther* **130**(1): 71-82.
- Prakriya, M. and R. S. Lewis (2001). "Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP_3 receptors." *J Physiol* **536**(Pt 1): 3-19.
- Putney, J. W., Jr. (2001). "Pharmacology of capacitative calcium entry." *Mol Interv* **1**(2): 84-94.
- Quignard, J. F., et al. (2001). "Transient down-regulation of L-type Ca^{2+} channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells." *Cardiovasc Res* **49**(1): 177-88.
- Raju, T. N. (2000). "The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936)." *Lancet* **356**(9226): 346.
- Rand, M. J. and C. G. Li (1995). "Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission." *Annu Rev Physiol* **57**: 659-82.
- Rosker, C., et al. (2004). " Ca^{2+} signaling by TRPC3 involves Na^{+} entry and local coupling to the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger." *J Biol Chem* **279**(14): 13696-704.
- Rybalkin, S. D., et al. (2002). "Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells." *J Biol Chem* **277**(5): 3310-7.
- Salido, G. M., et al. (2009). "TRPC channels and store-operated Ca^{2+} entry." *Biochim Biophys Acta* **1793**(2): 223-30.
- Salomonsson, M., et al. (2010). " Na^{+} -independent, nifedipine-resistant rat afferent arteriolar Ca^{2+} responses to noradrenaline: possible role of TRPC channels." *Acta Physiol (Oxf)* **200**(3): 265-78.
- Sampieri, A., et al. (2009). "Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member." *Cell Calcium* **45**(5): 439-46.
- Sausbier, M., et al. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." *Circ Res* **87**(9): 825-30.
- Sauzeau, V., et al. (2003). "RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation." *J Biol Chem* **278**(11): 9472-80.
- Schinner, E., et al. (2011). "Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation." *Platelets* **22**(3): 217-27.
- Schlossmann, J., et al. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP_3 receptor and cGMP kinase I β ." *Nature* **404**(6774): 197-201.
- Schlossmann, J. and M. Desch (2009). "cGK substrates." *Handb Exp Pharmacol*(191): 163-93.
- Schlossmann, J., et al. (2003). "Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases." *Ann Med* **35**(1): 21-7.
- Sgambato-Faure, V., et al. (2006). "The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump." *Biochem Biophys Res Commun* **343**(2): 630-7.
- Shuttleworth, T. J. and J. L. Thompson (1999). "Discriminating between capacitative and arachidonate-activated Ca^{2+} entry pathways in HEK293 cells." *J Biol Chem* **274**(44): 31174-8.
- Siefjediers, A., et al. (2007). "Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor subtypes at rat colonic epithelium." *Cell Calcium* **41**(4): 303-15.
- Smani, T., et al. (2004). "A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway." *Nat Cell Biol* **6**(2): 113-20.
- Smith, J. A., et al. (1996). "Autophosphorylation of type I β cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP." *J Biol Chem* **271**(34): 20756-62.
- Soboloff, J., et al. (2006). "STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} Entry." *Curr Biol* **16**(14): 1465-70.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." *Nature* **372**(6503): 231-6.

- Strehler, E. E., et al. (2007). "Plasma membrane Ca^{2+} ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling." Ann N Y Acad Sci **1099**: 226-36.
- Stull, J. T., et al. (1997). " Ca^{2+} /calmodulin-dependent myosin light-chain kinases." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **31**: 141-50.
- Sugiura, T., et al. (2008). "Proteolytic processing of cGMP-dependent protein kinase I mediates nuclear cGMP signaling in vascular smooth muscle cells." Circ Res **103**(1): 53-60.
- Takei, K., et al. (1994). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells." Neuron **12**(2): 327-42.
- Takeshima, H., et al. (1989). "Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor." Nature **339**(6224): 439-45.
- Tang, J., et al. (2001). "Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels." J Biol Chem **276**(24): 21303-10.
- Tasker, P. N., et al. (2000). "Expression and distribution of $\text{InsP}(3)$ receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **273**(3): 907-12.
- Taylor, C. W. (1998). "Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 19-33.
- Tiwari, S., et al. (2006). "Atherosclerosis-related molecular alteration of the human $\text{CaV}1.2$ calcium channel $\alpha 1C$ subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 17024-9.
- Toma, C., et al. (1996). "Activation of potassium currents by inhibitors of calcium-activated chloride conductance in rabbit portal vein smooth muscle cells." Br J Pharmacol **118**(3): 513-20.
- Trebak, M., et al. (2002). "Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition." J Biol Chem **277**(24): 21617-23.
- Vaandrager, A. B., et al. (1997). "Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine." Gastroenterology **112**(2): 437-43.
- Vazquez, G., et al. (2004). "The mammalian TRPC cation channels." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 21-36.
- Vazquez, G., et al. (2003). "Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation." J Biol Chem **278**(24): 21649-54.
- Venkatachalam, K., et al. (2003). "Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C." J Biol Chem **278**(31): 29031-40.
- Wagner, C., et al. (1998). "Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression." J Clin Invest **102**(8): 1576-82.
- Wagner, L. E., 2nd, et al. (2003). "Phosphorylation of type-1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cyclic nucleotide-dependent protein kinases: a mutational analysis of the functionally important sites in the $\text{S}2^{+}$ and $\text{S}2^{-}$ splice variants." J Biol Chem **278**(46): 45811-7.
- Wamhoff, B. R., et al. (2006). "Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle." Circ Res **98**(7): 868-78.
- Wang, C., et al. (2009). "Inhibition of SOC/ Ca^{2+} /NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells." Respir Res **10**: 123.
- Wang, X., et al. (2007). "Association of VASP with TRPC4 in PKG-mediated inhibition of the store-operated calcium response in mesangial cells." Am J Physiol Renal Physiol **293**(6): F1768-76.
- Wang, X., et al. (2004). "TRPC4 forms store-operated Ca^{2+} channels in mouse mesangial cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C357-64.

- Weber, S., et al. (2007). "Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme." Circ Res **101**(11): 1096-103.
- Wilson, D. P., et al. (2002). "Ca²⁺ activation of smooth muscle contraction: evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the triton insoluble fraction even in the absence of Ca²⁺." J Biol Chem **277**(3): 2186-92.
- Winder, S. J., et al. (1998). "Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin." Acta Physiol Scand **164**(4): 415-26.
- Woodsome, T. P., et al. (2001). "Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle." J Physiol **535**(Pt 2): 553-64.
- Wooldridge, A. A., et al. (2004). "Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides." J Biol Chem **279**(33): 34496-504.
- Worley, P. F., et al. (2007). "Homer proteins in Ca²⁺ signaling by excitable and non-excitable cells." Cell Calcium **42**(4-5): 363-71.
- Wray, S., et al. (2005). "Calcium signalling in smooth muscle." Cell Calcium **38**(3-4): 397-407.
- Wu, M. M., et al. (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." J Cell Biol **174**(6): 803-13.
- Xi, Q., et al. (2008). "IP₃ constricts cerebral arteries via IP₃ receptor-mediated TRPC3 channel activation and independently of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release." Circ Res **102**(9): 1118-26.
- Xia, C., et al. (2001). "Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases." J Biol Chem **276**(23): 19770-7.
- Yamamoto-Hino, M., et al. (1998). "Apical vesicles bearing inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the Ca²⁺ initiation site of ductal epithelium of submandibular gland." J Cell Biol **141**(1): 135-42.
- Yamamoto, K., et al. (2005). "Homer 1a enhances spike-induced calcium influx via L-type calcium channels in neocortex pyramidal cells." Eur J Neurosci **22**(6): 1338-48.
- Yang, L., et al. (2007). "Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits." Circ Res **101**(5): 465-74.
- Yaroslavskiy, B. B., et al. (2010). "Functional osteoclast attachment requires inositol-1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP-dependent kinase substrate." Lab Invest **90**(10): 1533-42.
- Young, R. C. and P. Zhang (2004). "Functional separation of deep cytoplasmic calcium from subplasmalemmal space calcium in cultured human uterine smooth muscle cells." Cell Calcium **36**(1): 11-7.
- Yuan, J. P., et al. (2003). "Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP₃ receptors." Cell **114**(6): 777-89.
- Zhang, S., et al. (2005). "Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulating cytosolic Ca²⁺ in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **288**(2): C245-52.
- Zhang, T., et al. (2007). "A cysteine-rich LIM-only protein mediates regulation of smooth muscle-specific gene expression by cGMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **282**(46): 33367-80.
- Zhao, G., et al. (2010). "Type 1 IP₃ receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells." J Gen Physiol **136**(3): 283-91.
- Zhou, H., et al. (2008). "Predominant role of type 1 IP₃ receptor in aortic vascular muscle contraction." Biochem Biophys Res Commun **369**(1): 213-9.

7.2 Eigene Veröffentlichungen

7.2.1 Abstracts

Hieke, B., Mehta, A., Crawford, R., Treharne, K., Schreiber, K., Kunzelmann, K. (2007), Functional characterisation of phosphorylation sites for AMP-Kinase in CFTR 86. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (Hannover, Germany)*.

Hieke, B., Salb, K., Schlossmann, J. (2009), Subcellular distribution of cGMP signalling proteins in VSMCs of IRAG KO mice 50. *Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Hieke, B., Schlossmann, J. (2009), Subcellular distribution of cGMP signalling proteins in vascular smooth muscle Cells of IRAG KO mice 4th *International Conference on cGMP, Generators, Effectors and Therapeutic implications (Regensburg, Germany)*.

Desch, M., Hieke, B., Bernhard, D., Hoecherl, K., Hofmann, F., Schlossmann, J. (2010), The role of IRAG in blood pressure regulation under physiological and pathophysiological conditions 51. *Jahrestagung der DGPT (Mainz, Germany)*.

Hieke, B., Desch, M., Schlossmann, J. (2011), Effect of inositoltriphosphate-receptor associated cGMP-kinase substrate (IRAG) on the store operated calcium entry (SOCE) in vascular smooth muscle 77. *Jahrestagung der DGPT (Frankfurt a.M., Germany)*.

7.2.2 Originalarbeiten

Kongsuphol P, Hieke B, Ousingsawat J, Almaca J, Viollet B, Schreiber R, Kunzelmann K. Regulation of Cl⁻ secretion by AMPK in vivo. *Pflugers Arch.* 2009 Mar;457(5):1071-8. Epub 2008 Aug 28.

Kongsuphol P, Cassidy D, Hieke B, Treharne KJ, Schreiber R, Mehta A, Kunzelmann K. Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27;284(9):5645-53. Epub 2008 Dec 18.

Almaça J, Kongsuphol P, Hieke B, Ousingsawat J, Viollet B, Schreiber R, Amaral MD, Kunzelmann K. AMPK controls epithelial Na⁺ channels through Nedd4-2 and causes an epithelial phenotype when mutated. *Pflugers Arch.* 2009 Aug;458(4):713-21. Epub 2009 Mar 31. Erratum in: *Pflugers Arch.* 2010 Nov;460(6):1105-6.

Desch M, Sigl K, Hieke B, Salb K, Kees F, Bernhard D, Jochim A, Spiessberger B, Höcherl K, Feil R, Feil S, Lukowski R, Wegener JW, Hofmann F, Schlossmann J. IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation. *Cardiovasc Res.* 2010 Jun 1;86(3):496-505. Epub 2010 Jan 15.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ich möchte hiermit all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes natürlich Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, und die Betreuung während der vergangenen Jahre.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth und PD Dr. Michael Bucher für das freundliche Überlassen allerlei Antikörper und Dingen des 'täglichen Bedarfs', sowie Prof. Warth für die Unterstützung bei den Membranpotentialmessungen

Frau Dr. Angela Jochim für die Einweisung in die Geheimnisse der Calciummessungen

Allen Promotionskollegen, als da wären Lisa, Katharina, Petra, Andrea, Steffi, Franzi und Irena und ExKollegen, Melanie, Heidrun und Miriam und insbesondere Matthias, für die Erheiterungen und Hilfestellungen im Laboralltag, den fachlichen Austausch und für den fachgerechten Ausgleich beim Trainieren. Ein spezieller Dank an Katharina fürs Aushelfen bei den Western Blots.

Allen technischen Assistenten, im besonderen Gertraud Wilberg und Maria Hirblinger für die Unterstützung bei der täglichen Arbeit.

Allen Kollegen am Lehrstuhl für Tips, Tricks, Hilfestellungen und erheiternden Gespräche

Herrn Dr. Markus Reichold für die unermüdliche Unterstützung bei EDV- und sonstigen Problemen und Fragen sowie für die Hilfe beim Patchen

Allen weiteren nicht namentlich genannten Personen, die auf die ein oder andere Weise ihren Anteil beigetragen haben. Insbesondere meinen Freunden, für die erholsamen und erbauenden Momente, und noch viel mehr meiner Freundin für ihre Geduld und Unterstützung

Und ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, für den Rückhalt und für die jahrelange Unterstützung und Förderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)